

TRABAJO

CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DEGRADACIÓN DE CLORPIRIFOS EN *Trichoderma spp.* AISLADAS DE SUELOS DE LA QUEBRADA DE HUMAHUACA

BIOINFORMATIC CHARACTERIZATION OF GENES ENCODING PROTEINS ASSOCIATED WITH CHLORPYRIFOS DEGRADATION IN *Trichoderma spp.* ISOLATED FROM SOILS OF THE QUEBRADA DE HUMAHUACA (HUMAHUACA GORGE)

Gómez, N. ¹, Romero, A. E. ¹, Hernández, N. E. ^{1,2,3*}, Maldonado, J. ^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Agrarias. UNJu; ² Instituto de Estudios Celulares, Genéticos y Moleculares (ICeGeM), UNJu; ³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*Autor para correspondencia:
nancy.hernandez@fca.unju.edu.ar

Período de Publicación:
Julio 2025

Historial:
Recibido: 28/12/24
Aceptado: 03/06/25

RESUMEN

El presente estudio se enfocó en la caracterización bioinformática de genes asociados a la degradación del plaguicida clorpirifós en cepas del género *Trichoderma* aisladas de suelos de la Quebrada de Humahuaca. Mediante herramientas moleculares y bioinformáticas, se analizaron las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de ADN extraído de las cepas *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperelloides*. Los resultados evidenciaron la presencia de genes asociados a la degradación de clorpirifós. El análisis filogenético permitió identificar una alta homología con secuencias de proteínas hipotéticas de *Trichoderma harzianum*. Estos hallazgos destacan el potencial biotecnológico de *Trichoderma spp.* para aplicaciones en biorremediación ambiental.

Palabras clave: Bioinformática, clorpirifos, *Trichoderma*, degradación

SUMMARY

This study focused on the bioinformatic characterization of genes associated with the degradation of the chlorpyrifos pesticide in the genus *Trichoderma strains* isolated from soils in the Quebrada de Humahuaca (Humahuaca Gorge). Using molecular and bioinformatic tools, nucleotide sequences obtained from DNA extracted from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperelloides* strains were analyzed. The results showed the presence of genes associated with chlorpyrifos degradation. Phylogenetic analysis allowed the identification of a high homology with hypothetical protein sequences of *Trichoderma harzianum*. These findings highlight the biotechnological potential of *Trichoderma spp.* for applications in environmental bioremediation.

Keywords: Bioinformatics, chlorpyrifos, *Trichoderma*, degradation

INTRODUCCIÓN

El clorpirifos es un plaguicida organofosforado de amplio espectro extensamente utilizado en contextos agrícolas e industriales, que se emplea en cultivos como frutas, hortalizas, granos, nueces, así como en el manejo de ganado, plantas ornamentales, campos de golf y tratamientos de madera (Watts, 2012). Su denominación según la IUPAC es O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-piridil-2-il fosforotioato, y su disposición estructural es responsable de su función como insecticida y de sus propiedades fisicoquímicas, entre las que destacan su baja solubilidad en agua y su alta afinidad por sedimentos y materia orgánica (Figura 1) (Watts, 2012). Comercialmente, se distribuye bajo nombres como Lorsban, Dursban, Suscon Green, Empire y Equity, siendo uno de los insecticidas más utilizados a nivel mundial, con propiedades que incluyen una elevada persistencia ambiental, capacidad de bioacumulación y toxicidad significativa para humanos y otros organismos no plagas. Estas características han llevado a su clasificación como posible contaminante orgánico persistente (COP), de acuerdo con los criterios establecidos por la Convención de Estocolmo (Watts, 2012).

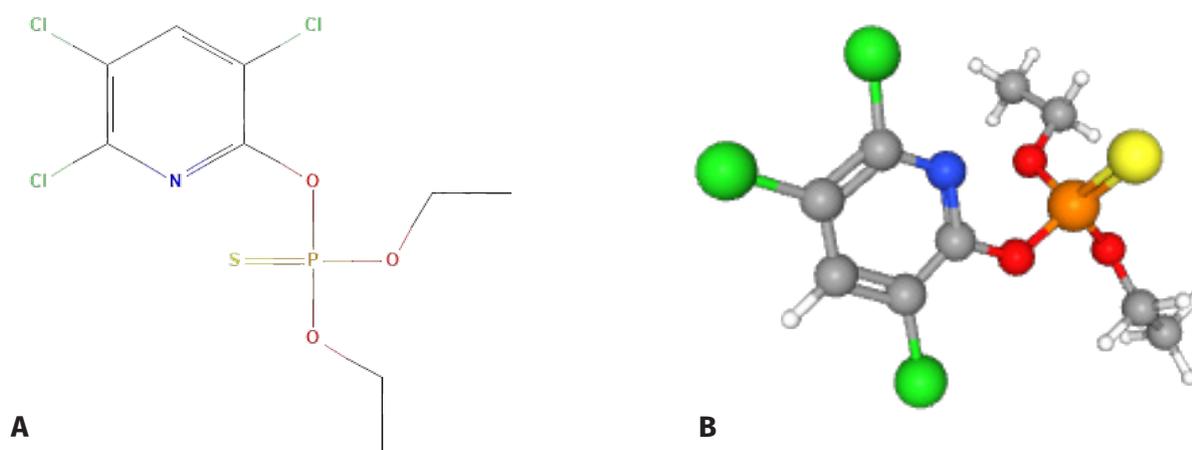


Figura 1: Representación estructural 2D (A) y conformación 3D (B) del clorpirifós. La molécula presenta un anillo piridínico con tres átomos de cloro en las posiciones 3, 5 y 6, unido a un grupo fosforotioato. (Watts,2012); *National Center for Biotechnology Information* (2024).

El clorpirifos actúa inhibiendo irreversiblemente la enzima acetilcolinesterasa (AChE), lo que genera una acumulación excesiva de acetilcolina en las sinapsis y provoca la sobreestimulación de receptores nicotínicos y muscarínicos en el sistema nervioso central y periférico (Figura 2). Esta sustancia representa un riesgo significativo para la salud humana debido a sus efectos adversos, tanto agudos como crónicos. Los efectos agudos incluyen síntomas como náuseas, vómitos, diarrea, debilidad muscular y dificultad respiratoria, pudiendo ser letales en casos extremos (cita). La exposición crónica a bajas dosis se ha asociado con alteraciones neurológicas, disfunción cognitiva, trastornos del comportamiento y un mayor riesgo de desarrollar enfermedades graves como cáncer y problemas endocrinos (Cita). Además, se han reportado afecciones relacionadas que incluyen obesidad, diabetes, síndrome metabólico, alteraciones del microbioma, trastornos del neurodesarrollo y enfermedades neurodegenerativas; por lo que se sospecha de otros blancos moleculares que podría estar afectando también además de la inhibición de la AChE (Eaton *et al.*, 2008; Eddleston *et al.*, 2008; Watts, 2012; Ventura *et al.*, 2016; Burke *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2019; von Ehrenstein *et al.*, 2019).

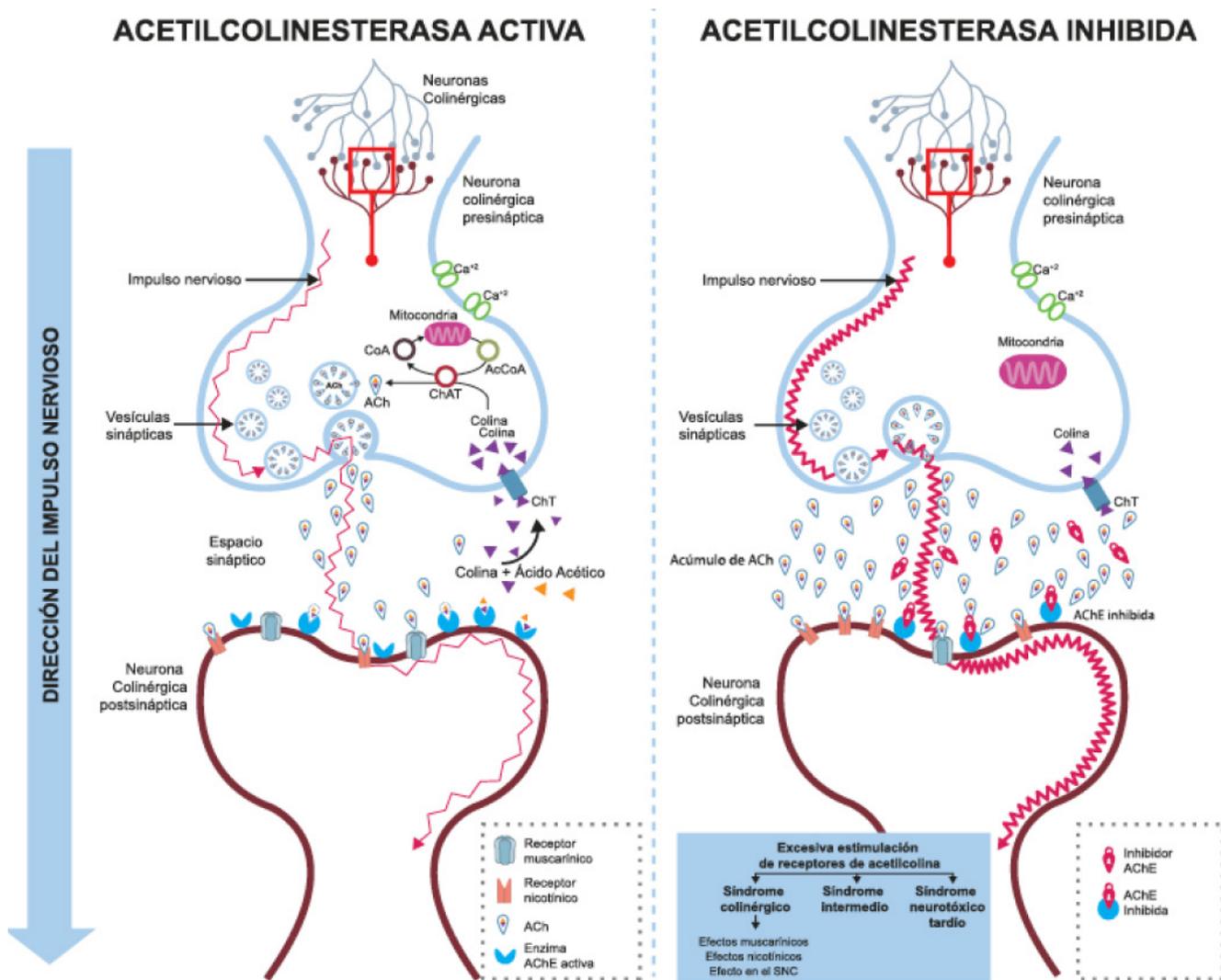


Figura 2: Mecanismo de acción e inhibición de la acetilcolinesterasa. Caro-Gamboa, et al., (2020).

Este compuesto organofosforado presenta propiedades fisicoquímicas que le otorgan un elevado potencial de transporte, permitiéndole desplazarse largas distancias desde las áreas donde ha sido aplicado. Como ha sido señalado por Watts (2012), esta sustancia se encuentra de manera sistemática en ecosistemas tan distantes como el Ártico, donde su presencia ha sido detectada en aire, hielo, nieve, sedimentos y organismos vivos, con registros tan antiguos como 1971. Este comportamiento confirma su capacidad para acumularse en entornos remotos y cumplir con los criterios de transporte a largas distancias establecidos por la Convención de Estocolmo (Watts, 2012). La dispersión transfronteriza de residuos de clorpirifós ha sido documentada en regiones alejadas de las áreas de producción agrícola, afectando tanto fuentes naturales como productos de origen vegetal y animal; como es el caso de Dinamarca y varios estados de la Unión Europea, donde a pesar de la prohibición de su uso aproximadamente un 33% de los cítricos importados desde Asia y otras regiones de la UE aún contienen residuos de este compuesto (Foong et al., 2020). Este fenómeno pone de manifiesto la insuficiencia de las prohibiciones aisladas, incluso en países desarrollados, para controlar la propagación global del clorpirifós. Esta limitación se explica por el hecho de que países en desarrollo, como India y China, mantienen su uso debido a su bajo costo y alta efectividad en el control de plagas (Foong et al., 2020). En este contexto, Watts (2012) subrayan la necesidad de tomar medidas internacionales coordinadas para mitigar los riesgos ambientales asociados al clorpirifós.

Dentro de estas medidas, la biorremediación se presenta como una opción prometedora, siendo una tecnología ambiental que utiliza la capacidad natural de los organismos vivos o sus productos para reducir, eliminar o transformar compuestos tóxicos en sustancias inocuas o menos contaminantes (Garbisu & Alkorta, 2001). La biorremediación se caracteriza por el empleo de diversos organismos, seleccionados por su capacidad para degradar compuestos tóxicos en el ambiente. Las bacterias y los hongos son especialmente relevantes debido a su versatilidad metabólica y adaptación a diversas condiciones ambientales. Al elegir microorganismos degradadores para aplicaciones biotecnológicas, se considera que la selección de organismos autóctonos es preferible para evitar impactos negativos en la microflora nativa (Rico & Pola, 2018). En los sistemas de biorremediación se emplean tanto microorganismos como sus enzimas de forma directa (Theriot & Grunden, 2011). Incluso, se trabaja en la utilización de microorganismos y/o enzimas modificadas para entornos complejos, ampliando las posibilidades de esta tecnología (Ronda *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2021). Dentro de los microorganismos estudiados, las bacterias han sido ampliamente investigadas debido a su capacidad degradativa, destacándose por la producción de fosfotriesterasas (PTE) y las organofosforohidrolasas (OPH), las cuales han sido identificadas como altamente eficaces en la degradación de una variedad de compuestos organofosforados. Estas enzimas, codificadas por los genes *opd* y *mpd*, se han aislado de bacterias como *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas diminuta* y *Agrobacterium radiobacter* (Sun *et al.*, 2019). Mientras que los hongos, aunque fundamentales en los procesos de degradación natural, han sido menos estudiados en comparación con las bacterias. Druzhinina *et al.*, (2018) subrayan la necesidad de estudiar hongos del género *Trichoderma*, por ser ampliamente reconocidos debido a su capacidad única para descomponer compuestos orgánicos, derivada en gran medida de la transferencia lateral de genes.

En estudios llevados a cabo por Sun *et al.*, 2020 se han reportado genes claves involucrados en la tolerancia y degradación de compuestos organofosforados en *Trichoderma atroviride*, los cuales destacan por su relevancia en procesos de bioremediación. El gen *hex1* ha sido descrito como fundamental para regular la tolerancia al estrés inducido por pesticidas, particularmente los diclorvos. Este gen participa en la síntesis de ergosterol en la membrana celular y en la formación de cuerpos de "Woronin", lo que disminuye la extravasación de electrolitos durante condiciones de estrés químico. Además, *hex1* modula la expresión de transportadores ABC, enzimas como el citocromo P450 y la glutatión-S-transferasa, contribuyendo así a la detoxificación y degradación del pesticida. En el mismo estudio, el gen *tapdr2* ha sido descrito como codificante de un transportador ABC, desempeñando un papel esencial en la resistencia a los diclorvos. Se ha demostrado que su eliminación reduce significativamente la tolerancia al compuesto, evidenciando su importancia en los mecanismos de defensa celular. Por último, Sun *et al.* (2020), destacan que el gen *tapon1-like*, que codifica la enzima TaPon 1-like, ha sido identificada como responsable de la hidrólisis inicial de enlaces P-O en compuestos organofosforados, siendo crucial para su degradación. La eliminación del gen *tapon1-like* en cepas *knockout* ha demostrado una reducción significativa en la eficiencia de degradación de diclorvos, lo que confirma su función crítica en el proceso bioquímico de degradación (Sun *et al.*, 2020). Además, estudios de expresión en *Escherichia coli* han permitido la purificación de la proteína recombinante reTaPon1-like, la cual ha mostrado actividad en la degradación de múltiples sustratos, incluidos los compuestos organofosforados (Sun *et al.*, 2020). Este gen muestra también similitudes estructurales importantes con el gen que codifica para la paraoxonasa humana (*HuPON1*), particularmente en su dominio de propela de seis aspas β y los sitios de unión al calcio, esenciales para su actividad catalítica. En estudios de comparación de secuencias, *tapon1-like* ha mostrado una homología con *HuPON1*, lo que respalda la hipótesis de que existe una evolución funcional convergente entre las paraoxonasas de *Trichoderma* y las de otros organismos, como los mamíferos, hallazgos que subrayan el potencial de *Trichoderma* en aplicaciones biotecnológicas para la remediación ambiental de pesticidas organofosforados (Sun *et al.*, 2020).

En la provincia de Jujuy, se han llevado a cabo estudios de caracterización de cepas de hongos del género *Trichoderma* aisladas de suelos de la Quebrada de Humahuaca. Dichas cepas se han identificado como *Trichoderma asperelloides* y *Trichoderma harzianum* (Álvarez, Benítez Ahrendts & Yasem de Romero, 2023). Por lo tanto, en base a los antecedentes descritos se propone como hipótesis de trabajo que el ADN de los hongos del género *Trichoderma* aislados de suelos de la Quebrada de Humahuaca contiene genes

codificantes de proteínas implicadas en la degradación de clorpirifós.

Objetivos de la Investigación: Identificar y caracterizar genes codificantes de proteínas degradadoras de clorpirifós, a partir de ADN de hongos del género *Trichoderma*, aislados de suelos de la Quebrada de Humahuaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ADN genómico utilizado pertenece a cepas del género *Trichoderma*, suministradas por la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy. La cepa 70 corresponde a *Trichoderma harzianum*, y la cepa 76, a *Trichoderma asperelloides*. La extracción de ADN fue realizada empleando el kit EasyPure Genomic DNA conforme al protocolo del fabricante.

Diseño y síntesis de cebadores

El diseño de cebadores específicos se realizó utilizando el servicio *Primer-BLAST*, a partir de las secuencias nucleotídicas del gen *tapon1-like*, obtenidas mediante la herramienta BLAST. En este proceso se consideraron parámetros esenciales como la longitud de los cebadores, la temperatura de fusión (T_m) y la ausencia de autocomplementariedad. Los cebadores seleccionados, *forward* y *reverse*, poseen 20 nucleótidos de longitud, característica clave para garantizar estabilidad y eficiencia en la amplificación. Las temperaturas de fusión determinadas para ambos cebadores se aproximaron a 60°C. Los cebadores diseñados fueron:

- **Forward:** 5´-ACAACCTCGTATGTGCAGCGA-3´

- **Reverse:** 5´-TGCAGCACCTTCTCCTTCT-3´

La optimización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) incluyó el cálculo de las temperaturas de fusión o *melting* (T_m) utilizando la fórmula:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Donde:

G, C, A y T representan la cantidad de bases nitrogenadas Guanina, Citosina, Adenina y Timina en cada cebador.

La temperatura de *annealing* o hibridación (T_a) fue determinada mediante la ecuación:

$$T_a = \left(\frac{T_{mf} + T_{mR}}{2} \right) - 5$$

Donde:

T_{mf} : Temperatura de fusión del cebador *forward*

T_{mR} : Temperatura de fusión del cebador *reverse*

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla reactiva (*Master Mix*) contiene ADN genómico de *Trichoderma* spp., cebadores (*forward* y *reverse*), nucleótidos libres, solución buffer y la enzima *Taq* polimerasa. La temperatura de *melting* se estableció en 60°C, mientras que la temperatura de *annealing* se calculó en 55°C, conforme a las

recomendaciones del NCBI y los cálculos realizados. La mezcla fue sometida a un ciclado térmico que incluyó fases de desnaturalización, alineamiento y extensión, repetidas en 35 ciclos para amplificar el ADN objetivo.

Evaluación y secuenciación de amplicones

Los amplicones generados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), lo que permitió estimar su tamaño y pureza. Los productos amplificados se enviaron a MacroGen para su secuenciación, utilizando la tecnología Applied Biosystems modelo 3730XL.

Edición y análisis de secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron editadas con el software *Chromas*, eliminando posiciones terminales. Posteriormente, se realizó un análisis filogenético mediante BLAST, utilizando el algoritmo *neighbor-joining* con 1.000 réplicas de *bootstrap*. La secuencia está siendo procesada para su depósito en el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA, *European Nucleotide Archive*), garantizando su accesibilidad para futuras investigaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Amplificación de genes implicados en la degradación de clorpirifós

Se realizó la PCR para amplificar posibles genes codificantes de proteínas degradadoras de clorpirifós en las muestras de ADN obtenidas de cepas del género *Trichoderma* aisladas de suelos de la Quebrada de Humahuaca. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y teñidos con el intercalante *Diamond™ Nucleic Acid Dye* para su visualización bajo luz ultravioleta en transiluminador (Figura 3). Los resultados indicaron que las cepas 70 y 76 presentaron una amplificación clara de fragmentos con un tamaño entre 1.500 y 2.000 pares de bases.

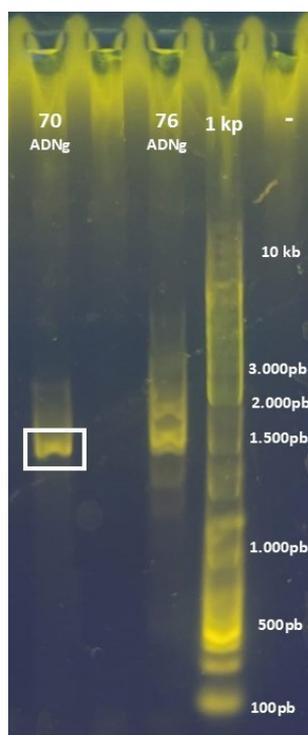


Figura 3: Gel de agarosa al 1%. Productos de PCR a partir de ADN genómico (ADNg) de las cepas 70 (*T. harzianum*) y 76 (*T. asperelloides*).

2. Edición de la secuencia de nucleótidos obtenida

A partir de las secuencias *Forward* y *Reverse* de nucleótidos obtenidas de la secuenciación, se ha llevado a cabo la edición mediante el software *Chromas* (Figura 4). Por motivos de calidad de las secuencias, se ha decidido trabajar únicamente, en los análisis posteriores, con la Secuencia Nucleotídica *Forward* editada de la cepa 70 (SN-F.edit/700), la cual tiene una longitud de 1.057 pb.

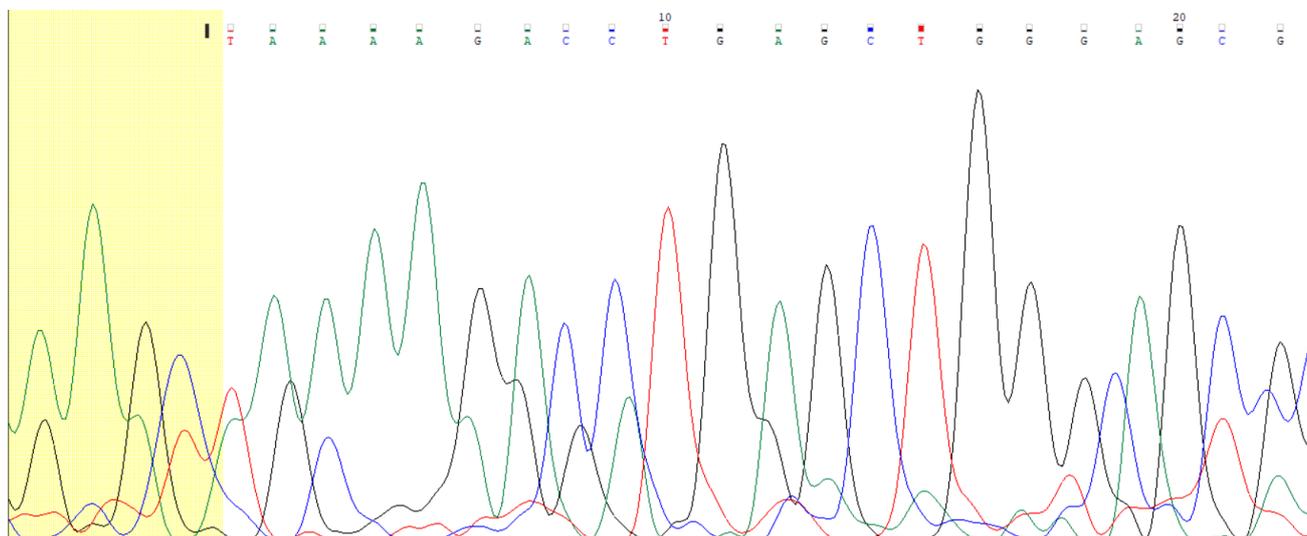


Figura 4: Cromatograma. Sección editada en Chromas de la secuencia nucleotídica *Forward* del amplicón de la cepa 70.

3. Comparación y análisis de la secuencia SN-F.edit/70

La comparación de la SN-F.edit/70 mediante BLAST permitió identificar tres alineamientos con valores significativos en similitud y cobertura en *GenBank* (Figura 5). El alto porcentaje de identidad observado en los alineamientos sugiere una posible función conservada entre estas proteínas. Además, los valores de E obtenidos (0.0 ; 2×10^{-128} y 2×10^{-108}) fueron extremadamente pequeños, indicando alta confiabilidad en los resultados y reforzando la fiabilidad de las coincidencias en las tres secuencias analizadas.

El alineamiento con mayor coincidencia se obtuvo con una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína hipotética de *Trichoderma harzianum* CBS 226.95, caracterizado por un 75% de cobertura y un 94.69% de identidad, lo que indicó un alto grado de homología. El valor máximo de puntuación (*Max Score*) alcanzó 1164, lo que valida esta secuencia como la más confiable, permitiendo inferir similitudes estructurales y funcionales (Altschul *et al.*, 1990). En contraste, el alineamiento con una proteína no caracterizada de *Trichoderma breve* presentó un 30% de cobertura y un 95.03% de identidad. Aunque el porcentaje de identidad fue alto, la menor cobertura y un Total Score de 473 sugirieron una coincidencia global menos significativa, posiblemente atribuible a la longitud de la secuencia o a regiones conservadas más cortas (Altschul *et al.*, 1990). Finalmente, se encontró un alineamiento con una proteína no caracterizada de *Trichoderma aggressivum f. europaeum*, que mostró un 30% de cobertura y un 91.06% de identidad.

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 3 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Trichoderma harzianum CBS 226.95 hypothetical protein (M431DRAFT_503877). mRNA	Trichoderma...	1164	1164	75%	0.0	94.69%	1486	XM_024918371.1	
Trichoderma breve uncharacterized protein (T069G_05890). partial mRNA	Trichoderma...	473	473	30%	2e-128	95.03%	783	XM_056173100.1	
Trichoderma aggressivum f. europaeum uncharacterized protein (Triagg1_10452). partial mRNA	Trichoderma...	407	407	30%	2e-108	91.06%	780	XM_062894525.1	

Figura 4: Alineamiento en BLAST de SN-F.edit/70 con proteínas hipotéticas y/o no caracterizadas de *Trichoderma* spp.

4. Construcción del árbol filogenético

En base al análisis anterior se construyó un árbol filogenético mediante BLAST para analizar la relación entre la SN-F.edit/70 y las tres secuencias nucleótidos que codifican para proteínas no caracterizadas o hipotéticas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma breve* y *Trichoderma aggressivum f. europaeum* (Figura 5). Los resultados son consistentes con la interpretación que señala una relación más cercana entre la SN-F.edit/70 y una secuencia nucleotídica de la cepa CBS 226.95 de *T. harzianum*, que codifica para una proteína hipotética (M431DRAFT_503877).

Para garantizar la robustez filogenética del árbol construido, se estableció un umbral máximo de divergencia nucleotídica entre las secuencias de 0,75. Este parámetro define la fracción máxima de sitios en los que dos secuencias presentan bases distintas en la región alineada. Aquellas parejas de secuencias que superan este umbral son excluidas del análisis filogenético, con el fin de evitar la inclusión de secuencias evolutivamente demasiado distantes. Es importante destacar que la distancia evolutiva entre secuencias, estimada a partir de la matriz de distancias, asume una relación lineal entre la proporción de sitios distintos y el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. Sin embargo, esta relación se debilita a medida que aumenta la divergencia secuencial. Por consiguiente, para valores superiores a 0,5 en el parámetro de divergencia máxima, aunque la agrupación de secuencias sea generalmente confiable, las longitudes de las ramas internas pueden subestimar la distancia evolutiva real entre secuencias muy divergentes (NCBI, 2024).

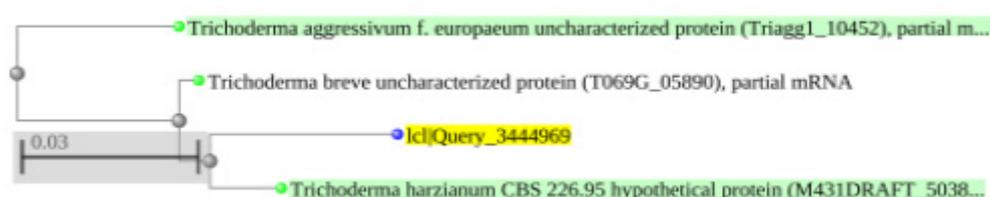


Figura 5: Dendrograma de secuencias nucleotídicas de *Trichoderma* spp. En amarillo la secuencia Query SN-F.edit/70 muestra su posición relativa en el árbol filogenético. Un valor de distancia de 0.03 sugiere que los organismos representados por los clados separados por esa distancia están relativamente cercanos evolutivamente.

CONCLUSIÓN

A través de análisis bioinformáticos se confirmó la presencia de genes codificantes de proteínas implicadas en la degradación de clorpirifós en cepas del género *Trichoderma* aisladas de suelos de la Quebrada de Humahuaca. Además, la construcción del árbol filogenético permitió la identificación de secuencias nucleotídicas evolutivamente cercanas.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, S., Benítez-Ahrendts, M., & Yasem de Romero, M. (2023). Caracterización de cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos de Jujuy-Argentina. *Revista Agraria de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 16(2), 36-50.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Rico, B. & Pola, L. (2018). *Biodegradación microbiana de carbofurano en suelos de cultivos de papa criolla Solanum phureja* [Trabajo de grado de maestría, Universidad de Pamplona]. Repositorio Hulago Universidad de Pamplona. <http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/handle/20.500.12744/2866>
- Burke, R. D., Todd, S. W., Lumsden, E., Mullins, R. J., Mamczarz, J., Fawcett, W. P., ... & Albuquerque, E. X. (2017). Developmental neurotoxicity of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos: From clinical findings to preclinical models and potential mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 142, 162-177. <https://doi.org/10.1111/jnc.14077>
- Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Zhang, J., Atanasova, L., Yang, D., Miao, Y., ... & Kubicek, C. P. (2018). Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLoS Genetics*, 14(4), e1007322. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007322>
- Eaton, D. L., Daroff, R. B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L. G., ... & Spencer, P. S. (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(sup2), 1-125. <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>
- Eddleston, M., Buckley, N. A., Eyer, P., & Dawson, A. H. (2008). Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *The Lancet*, 371(9612), 597-607. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61202-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61202-1)
- Foong, S. Y., Ma, N. L., Lam, S. S., Peng, W., Low, F., Lee, B. H., ... & Sonne, C. (2020). A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide in fruit and vegetables: Prevalence, remediation and actions needed. *Journal of hazardous materials*, 400, 123006.
- Garbisu, C., & Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: A cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77(3), 229-236. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00108-5)
- Liang, Y., Zhan, J., Liu, D., Luo, M., Han, J., Liu, X., ... & Wang, P. (2019). Organophosphorus pesticide chlorpyrifos intake promotes obesity and insulin resistance through impacting gut and gut microbiota. *Microbiome*, 7, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0635-4>
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 2730, Chlorpyrifos. Retrieved November 15, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos>.
- Ronda, C., Chen, S. P., Cabral, V., Yaung, S. J., & Wang, H. H. (2019). Metagenomic engineering of the mammalian gut microbiome in situ. *Nature Methods*, 16(2), 167-170. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0301-y>

- Sun, J., Karuppiah, V., & Chen, J. (2020). The mechanism of heavy metal absorption and biodegradation of organophosphorus pesticides by *Trichoderma*. En *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 303-318). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819453-9.00014-3>
- Sun, J., Yuan, X., Li, Y., Wang, X., & Chen, J. (2019). The pathway of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (DDVP) degradation by *Trichoderma atroviride* strain T23 and characterization of a paraoxonase-like enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 8947-8962. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10136-2>
- Theriot, C. M., & Grunden, A. M. (2011). Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 35-43. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2807-9>
- Ventura, C., Nieto, M. R. R., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Rodriguez, H., Cao, G., ... & Núñez, M. (2016). Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 156, 1-9.
- Von Ehrenstein, O. S., Ling, C., Cui, X., Cockburn, M., Park, A. ., Yu, F., ... & Ritz, B. (2019). Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: Population-based case-control study. *BMJ*, 364, l962. <https://doi.org/10.1136/bmj.l962>
- Watts, M. (2012). Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. *Pesticide Action Network Norteamérica (PANNA)*, 2-3.
- Xu, W., Zhao, S., Zhang, W., Wu, H., Guang, C., & Mu, W. (2021). Recent advances and future prospective of organophosphorus-degrading enzymes: Identification, modification, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(7), 1096-1113. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1898331>

ANEXO

- NCBI. (s. f.). *BLAST tree view*. National Center for Biotechnology Information. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview>