



## **Bacterias con potencial para biodegradar Carbofurano en suelos cultivados con papa criolla *Solanum phureja***

### **Bacteria with potential for biodegrading carbofuran in soils cultivated with "criolla potato" *solanum phureja***

**Leidy Paola Bautista Rico <sup>1</sup>; Amanda Lucía Chaparro Garcia<sup>2</sup>; Raúl Rodríguez Martínez <sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Bióloga, Universidad de Pamplona. leidybautistarico@gmail.com

<sup>2</sup> Docente, Universidad de Pamplona. achaparro@unipamplona.edu.co

<sup>3</sup> Docente, Universidad de Pamplona. rrodriguez@unipamplona.edu.

#### **Resumen**

El uso excesivo de plaguicidas se ha convertido en una de las principales causas de contaminación para los suelos agrícolas. Una alternativa biológica para eliminar estos compuestos es la biodegradación, una técnica basada en las propiedades metabólicas de los microorganismos para descomponer de forma natural los contaminantes. Por esta razón, se quiso evaluar la capacidad de degradación de las bacterias nativas *Pseudomonas* sp, *Serratia marcescens* y *Bacillus mycoides* frente al insecticida carbofurano del grupo carbamatos, el cual ha sido usado para controlar plagas en cultivos de papa criolla *Solanum phureja*, ubicados en la vereda San Agustín municipio de Mutiscua, Norte de Santander. Los ensayos de degradación se realizaron en reactores biológicos y bajo condiciones controladas, a partir de estos se efectuaron cinéticas de degradación y análisis del crecimiento microbiano. El analito fue evaluado por la técnica de espectrofotometría UV/Vis a una longitud de onda de 275nm. Los resultados obtenidos muestran que en un periodo de quince días *Bacillus mycoides* logra degradar un 56% del pesticida, *Serratia marcescens* el 60%, mientras que *Pseudomonas* sp pudo degradar el 73%. La capacidad de degradación se debe a que las bacterias emplearon el carbofurano como fuente de nutrientes (carbono y/o nitrógeno), adaptando sus mecanismos genéticos a procesos metabólicos enzimáticos que por síntesis oxidan, hidrolizan e hidroxilan el plaguicida ayudando a reducir la toxicidad del compuesto mediante actividad cometabólica o por mineralización completa.

*Palabras clave:* biodegradación, carbofurano, espectrofotometría UV-Vis, metabolismo.

#### **Abstract**

The excessive use of pesticides has become one of the main causes of pollution for agricultural soils. A biological alternative to eliminate these compounds is biodegradation, a technique based on the metabolic properties of microorganisms to naturally break down contaminants. For this reason, the degradation capacity of native bacteria *Pseudomonas* sp, *Serratia marcescens* and *Bacillus mycoides* was evaluate against the carbofuran insecticide of the carbamates group, which has been used to control pests in crops of "criolla potato" *solanum phureja*, located in the village of San Agustín municipality of Mutiscua, Norte de Santander. The degradation tests were carried out in biological reactors and under controlled conditions, degradation kinetics and microbial growth analysis were performed. The analyte was evaluated by the UV / Vis spectrophotometry technique at a wavelength of 275nm. The obtained results show that in a 15-day period *Bacillus mycoides* manages to degrade 56% of the pesticide, *Serratia marcescens*, 60%, while *Pseudomonas* sp. was able to degrade 73%. Possibly the degradation capacity is due to the fact that the bacteria used carbofuran as a source of nutrients (carbon and / or nitrogen), adapting their genetic mechanisms to enzymatic metabolic processes that synthesize oxidants, hydrolyze and hydroxylate the pesticides, helping to reduce the toxicity of the composed by comet activity or by

complete mineralization.

*Keywords:* biodegradation, Carbofuran, UV-Vis spectrophotometry, metabolism.

## 1. Introducción

La producción agrícola es de las actividades económicas que mayores afectaciones le genera al medio ambiente, debido a que los agroquímicos han convertido los suelos en depósitos de desechos tóxicos, el uso excesivo de plaguicidas produce efectos dañinos a los organismos debido principalmente a la movilización de estos productos a través del aire, agua y suelo, situación que afecta a los ecosistemas, produce transformación de microorganismos y perjudica la salud humana (Narishwar y Woodward,2013).

Uno de los plaguicidas más utilizados para el control de plagas en los cultivos es el carbamato carbofurano (Sun, Zhu y Wang, 2012). Dicho compuesto ha sido utilizado en los cultivos de papa criolla de la vereda San Agustín en el municipio de Mutiscua, por ello se requiere la búsqueda de alternativas para remediar esos suelos. La degradación microbiana, es una opción potencial, pues se basa en la capacidad metabólica de los microorganismos para utilizar los contaminantes como fuente adicional de carbono y energía (Rodríguez, 2012).

Esta investigación busca evaluar la capacidad de tres bacterias nativas, para

degradar el carbofurano en el suelo problema.

## 2. Metodología

### 2.1 Muestreo y análisis de suelos

El muestreo se realizó en la Vereda San Agustín del Municipio de Mutiscua, ubicada a 07°18'03"N y 72°44'49"O a una altitud de 2800 msnm; dicho lugar se eligió por ser reconocido como productor de papa criolla. Se seleccionaron tres parcelas experimentales con diferentes tiempos de siembra y fumigación con carbofurano, la cuarta o parcela control consistió en una zona sin antecedentes de siembras. El muestreo se realizó teniendo en cuenta las indicaciones mencionadas en la guía del laboratorio de suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi [IGAC] (2015). Las muestras fueron transportadas al laboratorio, en donde se procesaron de manera individual; tamizaje, homogenizado y cuarteo, posteriormente se realizó el análisis (tabla 1).

**Tabla 1.** Análisis fisicoquímicos realizados en suelos

Análisis Fisicoquímico	Método
pH	Electrométrico
Humedad	Gravimétrico
Fósforo	Bray II modificado
Materia orgánica	Walkley y Black

### 2.2 Aislamiento e identificación de microorganismos

La preparación de inóculos se realizó diluyendo 11 g de suelo en 99 mL de

90

solución salina estéril al 0,85%. A partir de dicha suspensión se realizaron diluciones seriadas y posteriormente las siembras en placa, usando como medio de cultivo agar nutritivo preparado en extracto de suelo. Las cajas se incubaron a 25°C durante 24 horas, y se procedió a la identificación de colonias crecidas, realizando siembras por aislamiento. La evaluación microscópica se hizo por tinción de Gram y en la morfología macroscópica se tuvo en cuenta la pigmentación, tipo de borde y tamaño de la colonia. Para obtener colonias puras se realizaron siembras en medios selectivos. La identificación por pruebas bioquímicas se realizó por la técnica de batería convencional (Fernández, García, Sáenz, y Valdezate, 2010).

### **2.3 Ensayos de crecimiento y degradación bacteriana**

Cada bacteria fue sembrada masivamente por triplicado en agar nutritivo a 25°C durante 24 horas. A continuación, la biomasa microbiana fue resuspendida en un medio de sales minerales y se llevó nuevamente a incubación, después de 72 horas dicha biomasa fue recuperada mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 5 minutos para el posterior ajuste de la concentración por espectrofotometría a una densidad óptica de  $0.500 \pm 0.005$  a 600nm (Castellanos *et al.*, 2013).

Los biorreactores se prepararon en Erlenmeyer que contenían 500 mL de medio mínimo mineral, carbofurano a una concentración 100 ppm y la bacteria

a una concentración final de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Los ensayos se realizaron por triplicado más el control. Posteriormente se incubaron a 25°C, con agitación de 90 rpm, totalmente cubiertos de la luz (Mendoza *et al.*, 2011). Diariamente durante quince días se tomaron muestras de 5 mL, las cuales se sometieron a centrifugación a 15,000 rpm durante 30 minutos, para separar el paquete celular del sobrenadante. La cuantificación del crecimiento bacteriano se realizó por el método de conteo en placa (Ortiz-Carrillo *et al.*, 2016).

Para determinar la degradación por cada una de las bacterias, el sobrenadante fue analizado por espectrofotometría Uv-Vis a una longitud de onda de 275nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Mendoza *et al.*, 2011).

### **2.4 Análisis estadístico**

Los datos de crecimiento y degradación fueron analizados en el software Origine 2017, versión de prueba. Se establecieron los promedios y desviación estándar para cada ensayo.

## **3. Resultados**

El análisis del suelo (tabla 2) permitió identificar bajas temperaturas, este factor ambiental presenta marcada influencia sobre las actividades microbianas pudiendo traer desventajas. Los pH determinados en las parcelas experimentales se consideran moderadamente ácidos y se encuentra dentro de los rangos ideales para el cultivo de papa criolla. En cuanto a la humedad se encontró variación, sin embargo, son rangos óptimos para que

las bacterias realicen sus reacciones metabólicas celulares.

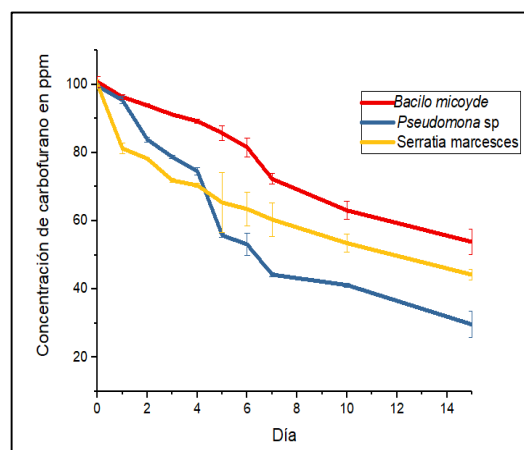
**Tabla 2.** Parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de suelo

Parámetro	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Parcela 4
Temperatura °C	15	17	20	18
pH	4,83	4,90	5,27	6,00
Humedad %	35,67	35,00	30,67	37,33
Fósforo ppm	159,6	231,3	68,00	34,00
Materia orgánica	55,78	70,94	28,85	50,44
Carbono orgánico	32,36	41,15	16,74	29,26

El análisis de morfologías bacterianas y las pruebas bioquímicas permitieron determinar la presencia del bacilo Gram positivo *Bacillus mycoide* y dentro de las bacterias con morfología de bacilos Gram negativos, se encontró a *Serratia marcescens* y *Pseudomonas sp.*

Los resultados de los ensayos de degradación (figura 1) indican que las tres bacterias empleadas presentan potencial de degradación del carbofurano, siendo *Pseudomonas sp.* la más efectiva al remover el 70% del plaguicida, mientras que *Serratia*

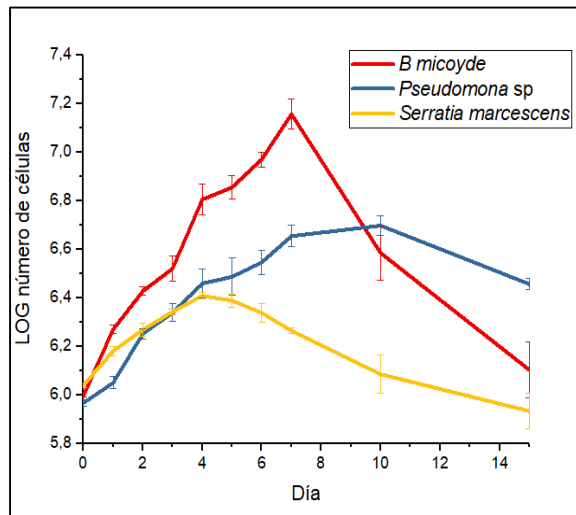
*marcescens* logro degradar un 56% y *Bacillus mycoide* el 53% del xenobiótico durante 15 días.



**Figura 1.** Biodegradación de carbofurano por parte de las bacterias.

El crecimiento de cada una de las bacterias durante el proceso de degradación del carbofurano (figura 2), indica que durante los primeros siete días *Bacillus mycoide* incrementó su número de células, y al relacionar con la degradación, se observa que durante esos días hubo mayor rendimiento. *Pseudomonas sp.* creció hasta el décimo día, durante el tiempo restante la biomasa disminuyó, pero el proceso de degradación continuo, *Serratia marcescens* alcanzó su máxima cantidad de UFC/mL durante los primeros cuatro días, y fue durante ese tiempo que

degrado mayor cantidad del xenobiótico.



**Figura. 2.** Crecimiento bacteriano durante el proceso de degradación del carbofurano.

Por lo tanto, se puede decir que los microorganismos empleados durante esta investigación al habitar en un ambiente contaminado por xenobióticos han evolucionado y adquirido la capacidad de degradar el carbofurano y utilizándolo como fuente de carbono y nitrógeno (Ortiz et al., 2013). Recientemente investigaciones han demostrado que la clave del metabolismo microbiano de los compuestos xenobióticos es la proteína activa o las enzimas de los microorganismos aplicados, lo que acelera significativamente la reacción metabólica (Fan et al., 2012).

Se ha encontrado que las enzimas hidrolasas e hidroxilasas son responsables de la degradación del pesticida carbofurano, el cual puede ser transformado en el medio ambiente (Yan et al., 2007); además se han descrito las rutas de degradación a través de las cuales se generan compuestos menos

tóxicos o perjudiciales para el medio ambiente (Ortiz et al., 2013).

## Conclusiones

Las bacterias nativas presentan la capacidad de degradar el carbofurano, siendo *Pseudomona sp.* la más eficiente con un 70% de remoción del compuesto en 15 días, por lo que estos microorganismos podrían ser usados en futuros proyectos de biorremediación *in situ*.

## Agradecimientos

A la universidad de Pamplona por los recursos humanos, tecnológicos y financieros aportados para la realización de este proyecto.

## Referencias Bibliográficas

- Castellanos, J., Sánchez, J., Uribe, Daniel., Moreno, L., y Melgarejo, L.M. (2013). Caracterización de Bacterias Degradadoras de Carbofurano Obtenidas de Suelos Bajo Cultivo de Papa y con Diferente Historia de Aplicación de Plaguicidas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 66(1), 6899-690 [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-28472013000100007&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472013000100007&lng=en&tlng=es).
- Fan, X., Liu, X., Huang, R., Liu, Y., (2012) Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach. *Microb. Cell*



Fact. (11) 33–44. doi: 10.1186/1475-2859-11-33

Fernández, A., García, C., Sáenz, J., & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia37.pdf>

Instituto Geográfico Agustín Codazzi – IGAC. (2015). Guía de recomendaciones para la toma de muestras para análisis del laboratorio nacional de suelos. Recuperado de <http://www.igac.gov.co/wps/wcm/connect/2a9cf2804bc71ca3a9d8af94c61b94/ok%2bguia%2bde%2btramites.pdf?mod=ajperes>

Mendoza, J. C., Perea, Y. S., Salvador, J. A., Morales, J. A., & Pérez, G. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2(3). <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3751637.pdf>

Narishwar-Ghimire, Richard-T. Woodward. (2013). Under and over use of pesticides: An international analysis. *Ecological Economics* (89) 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2013.02.003>.

Ortiz-Hernández ML, Sánchez-Salinas E, Dantán-González E, Castrejón-Godínez ML (2013) Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics and strategies to

enhance the process. *Biodegradation-life science*. Intech-publishing, Rijeka, pp. 251–287 doi: 10.5772/56098

Ortiz-Carrillo L., Rodríguez-Chona A, Cajiao-Pedraza, AM, Maldonado-Maldonado JI. 2016. Estudio cinético de bacterias metanogénicas a diferentes temperaturas. *Revista Bistua*. 14(1):39-48 doi: 10.24054/01204211.v1.n1.2016.1690

Pinzón M.I., Londoño A., Blach D., Gutiérrez JA., Rojas A M. 2013. Determination of organochlorine pesticides residue by  $\mu$ ECD in pineapple fruits (*Ananas comosus* L.) variety Golden MD2 in Quindío's Department. *Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 9(2):4-8

Sun, X., Zhu, Y., & Wang, X. (2012). Amperometric immunosensor based on deposited gold nanocrystals/4, 4'-thiobisbenzenethiol for determination of carbofuran. *Food Control*, 28(1), 184-191. doi:10.3390/s111211679

Yan QX, Hong Q, Han P, Dong XJ, Shen YJ. Li SP. (2007) Isolation and characterization of a carbofuran-degrading strain *Novosphingobium* sp. FND-3. *FEMS Microbiol Lett.* (271) 207-213. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00718.x

**L.P Bautista Rico**, Bióloga de la Universidad de Pamplona. Magister en biología molecular y biotecnología. Docente catedrático Universidad de Pamplona. Integrante activo del Grupo de Investigación en recursos naturales. <https://orcid.org/0000-0003-1742-0848>





**A.L Chaparro García**, Química de la Universidad Industrial De Santander UIS; Máster of Science.University of Massachusetts; Doctorado en Química University of Massachussets. Docente investigadora Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Básicas; Integrante activo del Grupo de Investigación en recursos naturales. <https://orcid.org/0000-0001-9728-0931>

**R. Rodríguez Martínez**, Bacteriólogo de la Universidad Industrial De Santander UIS; Maestría en microbiología Universidad Javeriana; Doctorado Microbiología y Genética Molecular. Universidad de Salamanca. Docente investigador Universidad de Pamplona. Facultad de Salud; Integrante activo del Grupo de Investigación en recursos naturales.

\*Para citar este artículo:Bautista Rico L.P; Chaparro Garcia A.L; Rodríguez Martínez.R. Bacteria with potential for biodegrading carbofuran in soils cultivated with "criolla potato" solanum phureja. Revista Bistua.2018.16(2):88-94.

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Leidy Paola Bautista Rico.Maestria en Biotecnologia. Universidad de Pamplona. [leidybautistarico@gmail.com](mailto:leidybautistarico@gmail.com)

Recibido: Noviembre 28 de 2017

Aceptado: Febrero 28 de 2018