

Biodegradación microbiana de carbofurano en suelos de cultivos de papa criolla
Solanum phureja.



Leidy Paola Bautista Rico

Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Maestría en Biología Molecular y Biotecnología
Pamplona
2018

Biodegradación microbiana de Carbofurano en suelos de cultivos de papa criolla
Solanum phureja.



Leidy Paola Bautista Rico

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Magister en Biología
Molecular y Biotecnología

Tutores

Raúl Rodríguez Martínez
Bacteriólogo, M.Sc., Ph.D.

Amanda Lucia Chaparro García
Química, M.Sc., Ph.D.

Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Maestría en Biología Molecular y Biotecnología

Pamplona

2018

Información general del proyecto:

Línea de Investigación:	Biotecnología
Grupo de investigación en donde está inscrito el proyecto:	Recursos Naturales
Lugar de ejecución del proyecto:	Las muestras de suelos fueron tomadas en la vereda San Agustín del municipio de Mutiscua, la parte experimental fue realizada en los laboratorios de la Universidad de Pamplona.
Fuente de financiación:	Vicerrectoría de Investigaciones de la universidad de Pamplona, convocatoria interna. Proyecto PR130-00-054(GA150-BP-II-2013-2.1.2.2.1)
Universidad de Pamplona, Pamplona 2018	

Dedicatoria

A mis padres por la formación que me brindaron, por enseñarme a salir adelante con paciencia y esmero hasta alcanzar la meta.

A mis hermanos por sus palabras de aliento, por estar pendientes de mí y ser incondicionales.

A mis sobrinos por motivarme a ser cada día mejor, por su cariño y compañía.

A mi compañero de vida, quien siempre me apoya, gracias Johneder tu amor me ha fortalecido para seguir adelante.

A mi hijo Juan Diego por llenarme de motivos para ser cada día mejor.

A todos los compañeros, amigos y seres queridos que han creído en mí, y con sus palabras de apoyo me han animado en este proceso.

Agradecimientos

A Dios por ser mi luz, mi refugio, mi fortaleza y compañía.

A mis tutores Raúl Rodríguez y Amanda Chaparro por confiar en mí y hacerme participe de sus proyectos, por su dedicación y apoyo para hacer posible lograr esta meta.

A la profesora Ángela Cajiao por compartir sus conocimientos, por sus asesorías, su dedicación y su respaldo académico y personal, es usted una gran persona.

A la Universidad de Pamplona por haberme dado la oportunidad de cursar este posgrado.

Al profesor Fredy Solano y compañeros de laboratorios de la Universidad por su colaboración para lograr la realización de este proyecto.

A la profesora Gladys Montañés por sus asesorías en estadística.

A todos los profesores y amigos que estuvieron pendientes de mi trabajo, muchas gracias.

Contenido

	Págs.
Resumen.....	12
Abstract.....	15
Capítulo I	17
Título.....	17
Introducción	17
Justificación.....	20
Pregunta de investigación.....	22
Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos.....	22
Capítulo II.....	23
Marco Referencial.....	23
Antecedentes	23
Antecedentes Internacionales	23
Antecedentes Nacionales.....	24
Antecedentes Regionales.....	24
Antecedentes Documentales.....	25
Marco teórico	25
El Suelo.....	25
Los Plaguicidas.....	26
Biodegradación.....	30
Biodegradación microbiana.....	30
Mecanismos de Biodegradación	31
Biodegradación del carbofurano	33

Espectroscopía infrarroja transform	
Espectroscopía Ultravioleta Visible	36
Método extracción dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)	37
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC / MS)	37
Capítulo III.....	39
Metodología	39
Diseño Metodológico	39
Área de estudio	39
Muestreo de suelos	39
Análisis fisicoquímico y ambiental	41
Identificación de los aislamientos.....	42
Pruebas de tolerancia al carbofurano.....	43
Análisis de microorganismos por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)	
.....	44
Preparación de muestras por liofilización.....	44
Identificación por espectroscopia FTIR.....	45
Análisis de espectros.....	45
Ensayos de biodegradación individual, a partir de solución acuosa.....	45
Preparación de la solución estándar de carbofurano.....	45
Cuantificación del carbofurano por espectrofotometría UV/Vis.....	46
Ensayos de biodegradación con bacterias.....	46
Ensayos de biodegradación con hongos	48
Ensayos de biodegradación en suelo por parte del consorcio microbiano	50
Preparación de Microorganismos	50
Preparación de carbofurano	51
Montaje de experimentos.....	51
Extracción de carbofurano por el método dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) ...	52
Cuantificación de carbofurano por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).....	52
Procesamiento y análisis de datos	53

Capítulo IV.....	55
Presentación e Interpretación de Resultados.....	55
Análisis fisicoquímico y ambiental.....	55
Aislamiento e identificación de la biota nativa.....	55
Tolerancia al carbofurano.....	59
Identificación de microorganismos por espectroscopía FTIR.....	62
Ensayos de biodegradación individual, a partir de solución acuosa.....	67
Ensayos de biodegradación con bacterias.....	69
Ensayos de biodegradación con hongos.....	70
Análisis estadístico de la degradación individual en solución acuosa.....	72
Ensayos de biodegradación en suelo por parte del consorcio microbiano.....	73
Discusión.....	77
Conclusiones.....	90
Recomendaciones.....	91
Bibliografía.....	92
Apéndices.....	111

Listado de Tablas

	Págs.
Tabla 1. Análisis fisicoquímicos de los suelos cultivados con papa criolla <i>S. phureja</i>	41
Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de suelo.	55
Tabla 3. Caracterización de los aislamientos microbianos.	56
Tabla 4. Bacterias aisladas e identificadas a partir del suelo.	57
Tabla 5. Características de los hongos aislados en agar PDA.	57
Tabla 6. Comparación de la frecuencia e intensidad de los picos encontrados en los espectros FTIR de las tres bacterias.	63
Tabla 7. Comparación de la frecuencia e intensidad de los picos encontrados en los espectros FTIR de los tres hongos.	65
Tabla 8. Análisis espectral de los modos de vibración en los diferentes rangos y asignación de atribuciones biomoleculares.	67
Tabla 9. Resultados de ANOVA.	72

Listado de figuras

	Págs.
Figura 1. Estructura química del carbofurano.....	28
Figura 2. Procesos realizados por los plaguicidas en el medio ambiente.	29
Figura 3. Vía de degradación del carbofurano por bacterias.	34
Figura 4. Vía de degradación del carbofurano por hongos.	34
Figura 5. Área de estudio.	39
Figura 6. Distribución de las parcelas.....	40
Figura 7. Montajes para biodegradación por bacterias.	48
Figura 8. Montajes de degradación en hongos.....	50
Figura 9. Montaje de degradación en suelo..	52
Figura 10. Procedimiento para la extracción de carbofurano por MSPD.	52
Figura 11. Bacterias aisladas y resistentes a diferentes concentraciones de carbofurano	60
Figura 12. Hongos aislados, resistentes y sensibles al carbofurano.	61
Figura 13. Espectros FTIR en la región de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1}	63
Figura 14. Espectros FTIR de los hongos.....	65
Figura 15. Espectro de absorción del carbofurano por UV/Vis.....	68
Figura 16. Curva de calibración para el carbofurano a una absorbancia de 275 nm por espectrofotometría UV/Vis.....	68
Figura 17. Cinética de degradación del carbofurano por parte de las bacterias, durante un periodo de quince días con una concentración inicial de 100 ppm.....	69
Figura 18. Cinética de crecimiento según la biomasa de las bacterias empleadas para los ensayos individuales de degradación del carbofurano durante un periodo de quince días en solución acuosa.....	70
Figura 19. Cinética de degradación del carbofurano por parte de los hongos, durante un periodo de quince días con una concentración inicial de 100 ppm.....	71
Figura 20. Crecimiento de los hongos durante los ensayos individuales de degradación del carbofurano en solución acuosa.	71
Figura 21. Cromatograma del patrón de carbofurano.....	73

Figura 22. Curva de calibración para el ca

Figura 23. Cromatogramas del análisis de muestras..... /4

Figura 24. Cinética de degradación de carbofurano por parte del consorcio microbiano. 75

Figura 25. Resultados obtenidos por análisis cromatógrafico de las muestras de suelo..... 76

Figura 26. Productos de degradación del carbofurano..... 80

Listado de Apéndices

	Págs.
Apéndice A. Análisis fisicoquímicos realizados al suelo.	111
Apéndice B. Identificación de Bacterias por morfología microscopía	112
Apéndice C. Identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas convencionales y API 20	113
Apéndice D. Identificación de hongos por microcultivos	114
Apéndice E. Liofilización de Microorganismos	115
Apéndice F. Ficha de seguridad del carbofurano empleado para los ensayos	116
Apéndice G. Bacterias seleccionadas para ensayos de degradación, cultivadas en agar nutritivo	117
Apéndice H. Hongos seleccionados para ensayos de degradación, cultivadas en agar PDA.....	118
Apéndice I. Montajes de ensayos de degradación individual en medio liquido	119
Apéndice J. Espectro UV/VIS del carbofuran a 275 nm, para determinar la capacidad de degradación de <i>Pseudomonas</i> sp. hacia el pesticida.....	120
Apéndice K. Modelo de las tablas empleadas para la recolección de datos en los ensayos de degradación individuales.	121
Apéndice L. Evidencia de control de crecimiento bacteriano por determinación de UFC/ml ...	122
Apéndice M. Evidencia de control de crecimiento de hongos por determinación del peso seco	123
Apéndice N. Evidencia de la extracción por MSPD.....	124
Apéndice O. Resultados de la cuantificación de carbofurano por CG/MS.....	125

Resumen

El uso excesivo de agroquímicos es una de las principales causas de contaminación para los suelos, lo que origina un desequilibrio socioambiental debido al deterioro que estos ejercen sobre la biota. Una alternativa biológica para reducir la contaminación del suelo es la biodegradación. El desarrollo de esta investigación permitió evaluar la capacidad de degradación de la microbiota presente en el suelo, frente al compuesto químico carbofurano, el cual ha sido usado para controlar plagas en los cultivos de papa criolla *Solanum phureja* (Juz. et Buk) de la vereda San Agustín municipio de Mutiscua, provincia de Pamplona.

Inicialmente se evaluaron las condiciones fisicoquímicas y ambientales del suelo puesto que estos parámetros influyen en la actividad metabólica de los microorganismos, posteriormente se aislaron e identificaron microorganismos autóctonos y se evaluó su capacidad de crecer en tres concentraciones diferentes de carbofurano; los microorganismos más eficientes fueron caracterizados por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y con ellos se realizaron ensayos de biodegradación.

Mediante el uso de reactores biológicos, se determinó la capacidad de degradación de cada microorganismo hacia el carbofurano, la cuantificación del compuesto se realizó por espectrofotometría UV/Vis, el crecimiento bacteriano se controló por conteo de UFC/ml, mientras que en los hongos se estimó el peso seco. La biodegradación por consorcios de microorganismos se hizo directamente en suelos y se evaluó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

Se encontró que el suelo con antecedentes de fumigación presenta variación en los parámetros fisicoquímicos respecto al suelo control, lo que pueden afectar o favorecer la actividad de los microorganismos. En el aislamiento e identificación se encontraron siete bacterias y siete hongos. Por su capacidad de tolerar el carbofurano las bacterias *Bacillus mycoide*, *Pseudomonas* sp. *Serratia marcescens*, y los hongos *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp. fueron seleccionados para los ensayos de degradación. Se encontró que durante quince días la remoción

de carbofurano ocurre en porcentajes de 54 %, 71 % y 56 % en el orden de las bacterias descritas, mientras que los hongos degradan respectivamente el 57 %, 73% y 81,6 % del xenobiótico.

Por otra parte, la degradación por parte del consorcio de microorganismos, indica que en quince días logran remover el 91,7% del pesticida en el suelo.

La degradación biológica del carbofurano, se debe posiblemente a que los microorganismos utilizan el compuesto como fuente de nutrientes (carbono y/o nitrógeno), y para ello han adaptado sus mecanismos genéticos a procesos metabólicos enzimáticos que por síntesis oxidan, hidrolizan e hidroxilan el carbofurano, reduciendo la toxicidad del compuesto mediante actividad cometabólica o por mineralización completa.

Palabras claves: cinética, degradación, microorganismos, pesticidas.

Abstract

The overuse of agrochemicals is one of the main causes of soil contamination, which causes a socio-environmental imbalance due to the deterioration they exert on the biota. One of the biological alternatives to reduce soil contamination is the biodegradation. The development of this research allowed evaluating the degradation capacity of the microbiota present in the soil, compared to the chemical compound carbofuran, which has been used to control pests in "papa criolla" crops (*Solanum phureja*) in the village of San Agustín municipality of Mutiscua, province of Pamplona.

The physicochemical and environmental conditions of the soil were evaluated initially since these parameters influence the metabolic activity of the microorganisms, later autochthonous microorganisms were isolated and identified and their ability to grow in three different concentrations of carbofuran was evaluated, the most efficient microorganisms were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and biodegradation tests were carried out with them.

Through the use of biological reactors, the degradation capacity of each microorganism towards carbofuran was determined, the quantification of the compound was performed by UV/Vis spectrophotometry, bacterial growth was controlled by CFU /ml count, while in fungi it was estimated the dry weight. The biodegradation by consortiums of microorganisms was done directly in soils and it was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS).

It was found that the soil with a fumigation background presents variation in the physicochemical parameters with respect to the control soil, which may affect or favor the activity of the microorganisms. In the isolation and identification process, seven bacteria and seven fungi were found. Due to its ability to tolerate carbofuran, *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas* sp. *Serratia marcescens*, and the fungi *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. and *Trichoderma* sp. were selected for the degradation tests. It was also found that during fifteen

days the removal of carbofuran occurs in percentages of 54%, 71% and 56% in the order of the bacteria described, while the fungi degrade respectively 57%, 73% and 81.6% of the xenobiotic.

Furthermore, the degradation on the part of the consortium of microorganisms indicates that in fifteen days they achieve to remove 91, 7% of the pesticide in the soil.

The biological degradation of carbofuran is possibly due to the fact that microorganisms use the compound as a source of nutrients (carbon and / or nitrogen), and for this they have adapted their genetic mechanisms to enzymatic metabolic processes that synthesize, hydrolyze and hydroxylase carbofuran, reducing the toxicity of the compound through cometabolic activity or completed mineralization.

Keywords: kinetics, degradation, microorganisms, pesticide,

Capítulo I

Titulo

Biodegradación microbiana de carbofurano en suelos de cultivos de papa criolla *Solanum phureja* (Juz. et Buk).

Introducción

El suelo es un recurso esencial para el medio ambiente, sirve de soporte para el desarrollo de cultivos agrícolas y la producción de alimentos, es el hábitat de muchos organismos y ejerce funciones ecológicas fundamentales, este recurso al igual que el aire y el agua ha sido afectado por el uso indiscriminado de compuestos tóxicos que son vertidos al ambiente causando contaminación.

Los plaguicidas tienen el propósito de combatir de manera eficaz organismos que pueden destruir o poner en peligro la producción agrícola. No obstante, mundialmente se ha dado un uso indiscriminado de estas sustancias, se estima que anualmente se consume una cantidad de 5,2 millones de estos compuestos (Grube et al., 2011). Esta es una de las razones por la cuales, la producción agrícola se ha definido como una 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 causando preocupación por el impacto negativo que ocasiona principalmente al equilibrio de los ecosistemas y a la seguridad alimentaria de la humanidad (Prashar & Shah, 2016).

El uso de plaguicidas en concentraciones superiores a las recomendadas por los fabricantes o inclusive en las dosis sugeridas, producen efectos fisiológicos dañinos en otros organismos que viven en el medio debido principalmente a la movilización de estos productos a través del aire, agua y suelo, situación que afecta en alto nivel a los ecosistemas, produce transformación de microorganismos y perjudican la salud humana (Flores, 2012).

Uno de los plaguicidas más utilizados para el control de plagas es el carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilcarbamato), se trata de un N-metilcarbamato (N-MC) de

actividad insecticida, acaricida y nematocida de amplio espectro para el control de plagas en una variedad de cultivos agrícolas (Sun, Zhu & Wang, 2012). Se puede encontrar en el mercado con otros nombres como furadan o carbofurano.

Este compuesto tiene alta toxicidad y relativamente alta solubilidad en agua 351 (mg/L), es muy móvil en el suelo, por lo que representa alto potencial de contaminación de agua subterráneas, superficiales y del suelo (Patcharaporn et al., 2013). Además, tiene efectos crónicos en organismos debido a que inhiben la colinesterasa, son neurotóxicos y afectan la reproducción (Dong et al., 2018).

En las plantas el carbofurano puede ser absorbido por las raíces y transportado a varios de sus órganos, especialmente al borde de las hojas (Zhu, Cao, Sun & Wang, 2013). La captación del carbofurano través de la exposición accidental puede causar toxicidad y muerte en los organismos y seres humanos (Satar et al., 2005).

Según la Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina, el carbofurano está prohibido en Europa y Canadá desde 2008, mientras que, en Estados Unidos, donde el 45% de las mujeres afroamericanas tiene niveles detectables en plasma, se encuentra desde el 2009 en proceso de prohibición total por la EPA (Pinilla, 2014). Actualmente, muchos países han restringido el uso de carbofurano en vegetales, árboles frutales, hierbas y té. En Argentina, Belice, Nicaragua y Chile ha sido restringido por sus efectos mutagénicos y ambientales, al comprobarse que es un contaminante de aguas subterráneas (Observatorio latinoamericano de conflictos ambientales, 2014).

En Colombia el carbofurano es un compuesto toxicológico que ha causado altos casos de letalidad (Mariño, 2015). Sin embargo, este compuesto fue comercializado libremente con el registro de Venta No. 621 del 4 de noviembre de 1996. (Ministerio del Ambiente, 2010). Solo hasta el periodo comprendido entre los años 2009 a 2015, el instituto Colombiano Agropecuario (ICA) canceló todos los productos cuyo ingrediente activo sea el carbofurano, por no superar los estándares mínimos en prevención y mitigación de daños a la salud humana y al medioambiente (ICA, 2017).

La gran persistencia de este compuesto análoga a la de muchos pesticidas de su familia, se traduce en tiempos de degradación prolongados, por ende, en efectos adversos a largo plazo sobre los ambientes cercanos y lejanos al punto de aplicación (Santucho, 2012).

La provincia de Pamplona se encuentra en la subregión del suroccidente del departamento Norte de Santander, presenta altitudes por encima de los 2000 metros sobre el nivel del mar y posee la mayor presencia de páramos en el departamento, con una extensión total de 72.166,52 de hectáreas. El relieve y la climatología entre otras características, la convierten en una zona estratégica para el desarrollo de cultivos agrícolas, entre los cuales se destacan la producción de frutales, hortalizas y tubérculos como la papa criolla, *Solanum phureja* (Plan de desarrollo para Norte de Santander 2012-2015).

La presente investigación permitió identificar que la mayoría de los productores agrícolas de la provincia, utilizan productos químicos en el manejo de plagas y enfermedades de sus cultivos. Los residuos de tales productos son adsorbidos por el suelo, generando así, su contaminación. Por la cantidad de amenazas a las que está sometido el suelo y por la importancia que tiene este recurso para la existencia de la humanidad, se hace necesario implementar labores para su conservación; por ello es fundamental el desarrollo de técnicas de descontaminación que permitan recuperar la calidad y el uso de este recurso (Pinilla, 2010).

La degradación de xenobióticos por parte de la microbiota autóctona, es una opción potencial para remediar sitios contaminados, debido a la capacidad metabólica de los microorganismos involucrados para utilizar los contaminantes como fuente adicional de carbono y energía (Rodríguez, 2012), teniendo en cuenta el hecho de que los microorganismos nativos se han adaptado a la exposición de plaguicidas después de haber estado en contacto con los suelos contaminados (Jiménez, 2014). Este mecanismo de degradación biológica requiere microorganismos adecuados, con habilidad fisiológica y metabólica para degradar los contaminantes, bajo condiciones ambientales correctas para que ocurra la degradación (Boopathy, 2000). Así mismo necesita del entendimiento de una serie de procesos ecológicos, fisiológicos y bioquímicos de las cepas degradantes (Sivagnanam & Jayanthi, 2013).

En esta investigación, se procedió inicialmente a aislar y caracterizar bacterias y hongos autóctonos de los suelos en donde se cultiva papa criolla *Solanum phureja*, posteriormente, se estudió la capacidad de biodegradación de los microorganismos hacia el compuesto químico carbofurano y se evaluaron las cinéticas de crecimiento y degradación. Para lograrlo se recurrió a técnicas que permiten la cuantificación del carbofurano como la espectrofotometría UV- Vis (Tamrakar et al., 2007) y la cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS); esta última es considerada actualmente la técnica preferida para determinar carbofurano, aunque es importante destacar que el pretratamiento de las muestras es complejo, el análisis requiere instrumentos costosos, así como de operadores capacitados (Liu et al., 2015).

Justificación

El IDEAM en su libro “El Medio Ambiente en Colombia” afirma que todas las tierras planas del país dedicadas a la agricultura intensiva presentan degradación física, química y biológica, debido a malas prácticas agrícolas y culturales, que producen entre otros factores: salinización, erosión, compactación y pérdida de nutrientes del suelo (IDEAM, 2004). Por lo anterior, es necesario buscar alternativas que permitan mitigar los impactos causados al medio ambiente y la degradación de los recursos naturales, el mal manejo de todo aquello que nos brinda la naturaleza no solo es una problemática ambiental, sino que afecta el entorno económico y social del país, ya que al poseer tierras infértiles se escasearía el trabajo y el alimento incrementando así la pobreza de la población (Serrato, 2013).

La productividad agrícola es considerada uno de los mayores causantes del deterioro del suelo (Vanwalleghem et al., 2017), aunque es una actividad vital, el uso de agroquímicos resulta dañino para la salud humana y los animales, y se ha demostrado que tiene un impacto ambiental perjudicial (Sivagnanam & Jayanthi, 2013). El Fondo para la financiación del sector agropecuario (Finagro) afirma que las perspectivas de crecimiento para el sector agropecuario en Colombia son positivas, y se explican principalmente por tres factores: primero el incremento en la demanda mundial de alimentos que se conjuga con las condiciones geoclimáticas colombianas y permiten el aumento sostenido de la oferta agropecuaria; segundo la evolución reciente del sector agropecuario que ha mostrado un crecimiento superior al de otros renglones de la

economía y tercero el incremento del gasto del Gobierno Nacional dirigido al sector agropecuario (Finagro, 2014)

El país no dispone de información precisa sobre área cultivada con papa criolla. Estimativos de la federación colombiana de productores de papa (Fedepapa) reportan que este cultivo corresponde al 10% o 16% del área sembrada en papa común. Se cultiva en pequeñas áreas al margen del cultivo de papa común, en surcos dentro del mismo, o en huertas familiares. Los principales departamentos productores en Colombia son Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Antioquia, Cauca, Norte de Santander y Santander (Gómez, 2015).

Los principales municipios productores de papa criolla en Norte de Santander son Mutiscua, Silos, Chitagà, Pamplona y Cécota los cuales pertenecen a la provincia de Pamplona donde la principal actividad económica es la agricultura, siendo la papa criolla *Solanum phureja* uno de los productos más representativos. Los cultivos en ocasiones se han visto afectados por plagas como la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Povolny), lo cual conlleva a que los agricultores requieran el uso de insecticidas como el carbofurano; por ello es importante realizar investigaciones encaminadas a eliminar o reducir las concentraciones de dicho pesticida en estos suelos.

La biodegradación es una excelente alternativa para la remoción de xenobióticos en los suelos, pues se basa en la capacidad metabólica de los microorganismos para generar metabolitos menos tóxicos para el ambiente y lograr una descontaminación progresiva del suelo. Por este motivo, se realizó la identificación de bacterias y hongos autóctonos del suelo problema y se determinó su capacidad de degradación del carbofurano, estableciendo las cinéticas de dicho proceso, los resultados permitirán a futuro, hacer la remediación del xenobiótico en el suelo destinado a los cultivos de papa criolla.

Pregunta de investigación

¿Cuál es la capacidad de los microorganismos nativos para degradar el pesticida carbofurano presente en los suelos de cultivo de papa criolla *Solanum phureja* ubicados en la vereda San Agustín de la Provincia de Pamplona?

Objetivos**Objetivo general.**

Evaluar la capacidad que tiene la población microbiana nativa aislada de suelos cultivados con papa criolla (*Solanum phureja*) para biodegradar el pesticida carbofurano.

Objetivos específicos.

Determinar las condiciones físicas, químicas y medioambientales de los suelos de cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*), con el fin de establecer dichos parámetros técnicos, durante la biodegradación del carbofurano a escala de laboratorio.

Identificar poblaciones microbianas nativas que tengan la capacidad de tolerar y biodegradar el carbofurano.

Estimar la cinética de crecimiento de microorganismos y degradación del plaguicida empleando cepas individuales a partir de una solución acuosa y teniendo en cuenta las variables que condicionan el proceso de biodegradación.

Analizar el proceso de biodegradación en el suelo mediante cromatografía de gases acoplada a masas.

Capítulo II

Marco Referencial

Antecedentes

Las problemáticas por contaminación ambiental que afectan los recursos naturales han llevado a los investigadores a realizar trabajos en la búsqueda de alternativas que permitan contribuir en la recuperación de dichos recursos (Gray, Bewers & He, 2018).

Antecedentes Internacionales.

En su investigación (Jiménez, 2014) de la Universidad de Veracruzana de México, realizó su trabajo de investigación de maestría denominado: “*Degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión por cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola*”. De dicho trabajo concluyó que las bacterias aisladas fueron capaces de metabolizar los compuestos en tan solo 18 días.

En su investigación (Medina, 2014) de la Universidad Católica De Santa María, Arequipa Perú, realizó su trabajo de investigación titulado: “*Determinación de clorpirifos en leche de vacuno por voltamperometría, HPLC y GC-MS y su alternativa de remoción con micorrizas arbusculares*”. En este trabajo se desarrolló un método para la cuantificación del pesticida clorpirifos, allí se aplicó la GC-MS y resulto de alta eficiencia para detectar remoción de dicho compuesto por parte de las micorrizas.

En su investigación (Lee, 1997) de la Universidad de Florida, Estados Unidos, realizó su investigación de doctorado denominada: “*Mejoramiento de la degradación de carbofurano en el suelo con historia de aplicación repetida de carbofurano y caracterización de aislados bacterianos del suelo*”. Este estudio concluye que en los suelos con antecedentes de aplicación del carbofurano se da una mejor biodegradación que en aquellos sin dicha exposición, y que dicha degradación se debe a que los microorganismos hidrolizan el compuesto y el número de estos aumenta por las sucesivas aplicaciones de pesticida. Se determinó la hidrólisis como principal vía de degradación.

Antecedentes Nacionales.

En su investigación (Lopez, 2014) de la Universidad de Cartagena, Colombia, realizó su trabajo de investigación de maestría en química denominado: “*Determinación de contaminantes organofosforados en leche de ganado bovino y suelos de cultivo provenientes del municipio de San Bernardo del Viento, Córdoba, y obtención de cepas bacterianas nativas del suelo con capacidad degradadora de este tipo de contaminantes*”. Se identificó la capacidad de los microorganismos para crecer en medios de cultivos con estos contaminantes en concentraciones de 200 ppm.

En la investigación de Mosquera (2007) de la Universidad de Antioquia, Colombia, en su trabajo de grado como magister en Química titulado: “*Biodegradación del malatión utilizando microorganismos nativos de suelos agrícolas*” logró estandarizar un método para la cuantificación del pesticida, con altos porcentajes de recuperación. Los ensayos se realizaron a nivel de laboratorio y en campo, encontrándose que el compuesto químico en altas concentraciones afectaba la biota, pero a bajas concentraciones los microorganismos tenían la capacidad de emplearlo como fuente energética.

Antecedentes Regionales.

El trabajo de tesis de maestría realizado por Castellanos (2008) de la Universidad Nacional de Colombia, se denominó: “*Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de carburan presentes en suelos cultivados con papa (Solanum tuberosum) del municipio de Silos Norte de Santander*”. Un resultado de este trabajo fue la identificación de las cepas *Sphingomonas paucimobilis*, y su capacidad para degradar eficientemente el anillo aromático del carburan como única fuente de carbono y nitrógeno.

En la Universidad de Pamplona se han desarrollado investigaciones relacionadas con la detección de pesticidas por métodos analíticos, entre ellas están: “*Estandarización de un método analítico para extracción y cuantificación del insecticida cipermetrina en pastos*” (Cardona, Chaparro, Calderón, Peláez & García, 2011). “*La Identificación de carbamatos en el cultivo de durazno: suelo y fruto producido en Pamplona, Colombia*” (Quijano & Portilla,

2016). “*Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para la determinación de carbofurano en suelos*” (Chaparro et al., 2017). Estos trabajos han sido valiosos para conocer sobre el estado de los suelos de la región y la persistencia de los pesticidas que se aplican a los cultivos.

Antecedentes Documentales.

En su investigación (Castellanos et al., 2013) realizaron el estudio sobre microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de pesticidas metilcarbamatos, en este se habla de las vías y productos de degradación de los carbamatos, así como de las enzimas implicadas en este proceso. Dicha investigación resulto valiosa para interpretar los resultados obtenidos en este trabajo.

En el Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA), de la Universidad de Costa Rica (UCR) en el año 2016 (Castro et al., 2016) utilizaron birreactores con consorcios bacterianos y encontraron que los microorganismos lograron degradar el carbofurano en tan solo 17 horas, así como otros pesticidas del grupo carbamatos, comprobando el potencial de bacterias como *Pseudomonas* sp. para la eliminación de estos plaguicidas de aguas residuales agrícolas.

Por otra parte, Otieno et al., (2011) estudiaron la dinámica de las comunidades microbianas degradantes de carbofurano en el suelo durante tres aplicaciones anuales sucesivas de carbofuran. Para ello analizaron el pesticida empleando la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas, lo que permitió saber que de esta forma se podría realizar una eficiente cuantificación del pesticida al evaluar la degradación en suelo.

Marco teórico

El Suelo.

El suelo es una capa delgada que se ha formado muy lentamente, a través de los siglos, con la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, los cambios de temperatura y el viento, en él se encuentran plantas y animales que crecen y mueren para finalmente ser descompuestos por los microorganismos, transformándose en materia orgánica (FAO, 2018).

Dentro de las características del suelo se mencionan sus propiedades físicas como la estructura, textura, color y capacidad para sostener el agua; como propiedades químicas se encuentran la Capacidad de Intercambio Catiónico (CEC), el pH, la humedad y cantidad de nutrientes que contenga (Seminis, 2016).

El suelo se reconoce como uno de los más diversos hábitats en el planeta conteniendo miles de organismos los cuales obran recíprocamente y aportan servicios esenciales para los ciclos globales haciendo posible la vida en el planeta tierra (FAO, 2018). Dicho recurso realiza funciones ambientales importantes como ser el sustento de alimento para las plantas, almacenar nutrientes, poseer y albergar materia orgánica proveniente de restos animales y vegetales, es el hábitat de diversos organismos que transforman la materia orgánica presente en él, entre otros factores que lo hacen esencial en el desarrollo de los ecosistemas de los cuales forma parte (Drobnik et al., 2018).

Entre los diversos usos que se han dado al suelo, la agricultura es una de las actividades productivas que más han conducido a la degradación y pérdida irrecuperable de este recurso (Drobnik et al., 2018). Las prácticas agrícolas han causado gran impacto sobre el suelo, como la reducción en el número y especies de organismos, disminución de la cantidad y calidad de residuos vegetales incorporados al suelo y el descenso en el rango de hábitat y fuentes de alimentación para los organismos del suelo.

Los manejos agrícolas modernos tales como el uso de pesticidas han reemplazado las funciones biológicas del suelo ha llevado a la dependencia de insumos externos para mantener la productividad lo que conduce a que este recurso se torne insostenible a largo plazo (FAO, 2018).

Los Plaguicidas.

El término "plaguicida" abarca una diversidad de productos que se utilizan en una serie de actividades diferentes y están destinados a prevenir, destruir, repeler o mitigar las plagas. Su introducción en el medio ambiente ya sea mediante la aplicación, eliminación o un derrame, pueden ser influenciados por muchos procesos, ya sea translocados, transformados o absorbidos.

La movilidad de los plaguicidas en el suelo está guiada por el pH, la materia orgánica, la humedad, el contenido de arcilla y el coeficiente de distribución (K_d) de plaguicida. Los peligros de los plaguicidas en el suelo dependen en gran medida de su persistencia. Cuanto más tiempo persisten, mayores son las posibilidades de contaminación del suelo (Pam, 2015).

Actualmente existe un gran número de plaguicidas en uso, con una amplia gama de propiedades fisicoquímicas que rigen su comportamiento en el suelo y su actividad biológica. El tamaño molecular, la ionizabilidad, la solubilidad en agua, la lipofilicidad, la polaridad, la volatilidad y la persistencia son todas propiedades clave, pero generalmente una o dos propiedades tienen una influencia dominante (Fishel, 2017).

Los plaguicidas presentan múltiples clasificaciones en función de algunas de sus características principales; su toxicidad aguda, la vida media, su estructura química y su uso. Según el tipo de organismo que se desee controlar, se clasifican en insecticidas, garrapaticidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas, ovicidas, bactericidas, fungicidas y herbicidas. De acuerdo con el grupo o familia química, dichos compuestos se clasifican en: organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, derivados biperidilos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados cloronitrofenólicos, derivados de las triazinas, compuestos orgánicos del estaño, compuestos inorgánicos y los compuestos de origen botánico (Del Puerto, Suárez & Palacio, 2014).

Los carbamatos se conocen químicamente como derivados del ácido carbámico, la mayoría de los compuestos de este grupo carecen de selectividad de especie, lo que representa un gran peligro para el medio ambiente y para la salud humana y animal, pues son extremadamente tóxicos después de la exposición aguda (Dhouib et al., 2016).

El carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato), de fórmula molecular $C_{12}H_{15}NO_3$ (Figura. 1) es un insecticida y acaricida de contacto, sistémico y de amplio espectro usado en la agricultura para controlar una gran variedad de plagas en los cultivos (Lara & Chaparro, 2017).

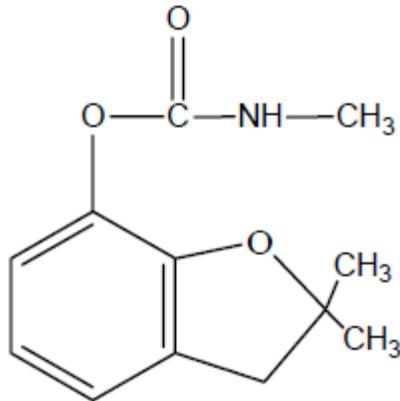


Figura 1. Estructura química del carbofurano.

Gbadegesin, et al., 2014

Según la Environmental Protection Agency (EPA) el carbofurano causa carbamilación reversible de la enzima acetilcolinesterasa, lo que permite la acumulación de acetilcolina, la sustancia neuromediadora en las uniones neuroefectoras parasimpáticas (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del musculo esquelético y en los ganglios autónomos (efectos nicotínicos), así como en el cerebro, en el movimiento los sentidos, como el tacto, la audición, la vista, el gusto y el olfato y el corazón (Dong et al., 2018).

Este compuesto es muy tóxico para los mamíferos, por lo que se clasifica como altamente peligroso, su dosis letal para en ratas es de LD50 50 mg/kg. Sus propiedades tóxicas incluyen la inhibición de la acetilcolinesterasa, convulsiones violentas y trastorno neuromuscular si se inhala, también se reporta que es teratogénico, genotóxico, mutagénico, hepatotóxico, y debido a su efecto en el sistema reproductivo, ha sido catalogado como uno de los productos químicos disruptores endocrinos (Gbadegesin et al., 2014).

La alta toxicidad del carbofurano y sus metabolitos en animales y seres humanos, sumada a las malas prácticas de manejo asociadas entre otras a la sobredosificación, lo han convertido en un riesgo para la salud pública (Hmimou et al., 2014).

El riesgo de que este compuesto afecte plantas y microorganismos, o su presencia en el agua en altas cantidades, depende de su concentración en el suelo y de los procesos de absorción y desorción. Debido a su alta solubilidad en agua y bajo coeficiente de adsorción el carbofurano es relativamente móvil en el suelo, en consecuencia, tiene el potencial de contaminar lagos, arroyos y agua subterránea. Su estabilidad a pH menores a 7, dada por sus grupos funcionales indica que es un contaminante persistente en suelos neutros o ácidos y su biodegradación ocurre de manera lenta, ya sea por microorganismos o de forma química mientras que en suelos alcalinos se hidroliza (Song, 2014).

La Figura 2 muestra el destino de los plaguicidas en el medio ambiente. De hecho, el suelo agrícola sirve como sumidero final para los agroquímicos, donde los microorganismos del suelo involucrados en la biorremediación contribuyen a reducir la carga contaminante (Bano & Musarrat, 2004).

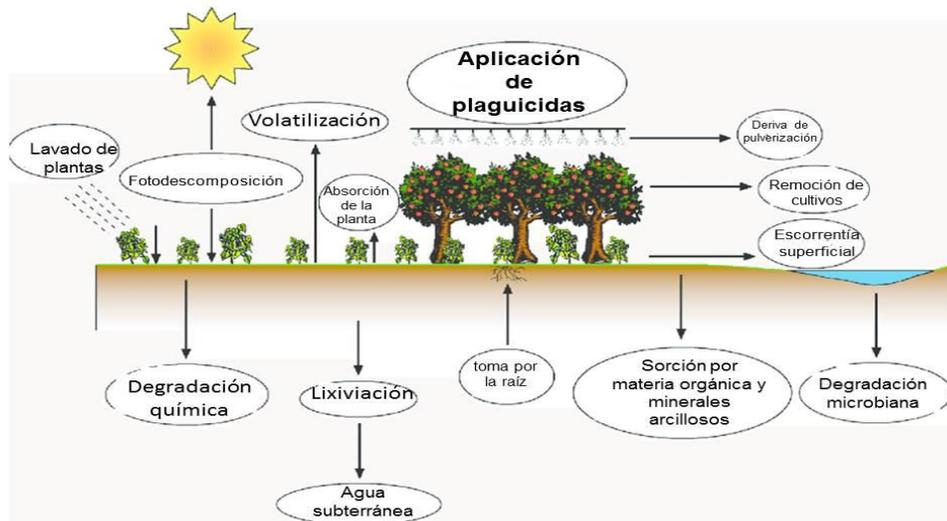


Figura 2. Procesos realizados por los plaguicidas en el medio ambiente.

T Sarmah Ajit K, Müller Karin Ahmad Riaz (2004)

Biodegradación.

Biodegradación microbiana.

La microbiota del suelo contiene una gran variedad de organismos microscópicos formada entre otros, por miles y millones de bacterias, actinomicetos, hongos y protozoos y cumplen un papel esencial en los procesos biogeoquímicos de la materia. Los microorganismos son responsables de la dinámica de transformación y desarrollo tanto ambiental como agronómico, y pueden ser empleados para eliminar la contaminación originada por nuestra actividad humana. A través de un proceso denominado biodegradación microbiana, los microorganismos consumen o degradan contaminantes como el petróleo, disolventes, pesticidas y otros productos tóxicos contaminantes, en sustancias inocuas que puedan ser recicladas al medio ambiente (López, 2015).

Los microorganismos que habitan en ambientes contaminados con compuestos xenobióticos evolucionan para degradar y utilizar muchos de estos compuestos químicos (Betancur et al., 2013). Diversos trabajos de investigación han demostrado que la clave del metabolismo microbiano de los compuestos xenobióticos radica en la variedad de enzimas producidas por los microorganismos, lo que acelera significativamente la reacción metabólica, y la transformación del compuesto (Fan et al., 2012; Zhai et al., 2012). Los plaguicidas proporcionan adecuada fuente de carbono y donan electrones a ciertos microorganismos del suelo estableciendo una forma de tratamiento de los sitios contaminados (Beibei et al., 2018).

Se ha encontrado que los microorganismos que llevan a cabo un proceso definido como la degradación de compuestos xenobióticos recalcitrantes, tienen mejores resultados cuando están asociados con otros organismos en un consorcio. Se han observado ejemplos de este comportamiento para la degradación de compuestos tales como los pesticidas (Wolfaardt, Korber & Lawrence, 2007).

La transformación de compuestos químicos no solo depende de la presencia de microorganismos con enzimas degradadoras apropiadas, sino de un amplio rango de factores relacionados con la habilidad de los microorganismos del suelo para degradar naturalmente los

contaminantes. Aspectos fisiológicos, ecológicos, bioquímicos y moleculares, juegan un papel importante en la transformación microbiana de contaminantes (Vischetti, Casucci & Perucci, 2002). Dentro de los factores abióticos se incluye la cantidad de nutrientes, pH, temperatura, humedad, oxígeno, características del suelo y la biodisponibilidad del contaminante. Como factores bióticos son fundamentales la composición, la adaptabilidad y capacidad fisiológica de las poblaciones microbianas, por tanto, optimizar estas condiciones ambientales podría mejorar la biodegradación de los contaminantes en el suelo (Betancur et al., 2013).

Mecanismos de Biodegradación.

El aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de degradar, transformar o eliminar pesticidas brinda la posibilidad de contar con nuevas herramientas para restaurar ambientes contaminados o para tratar los desechos antes de la disposición final (Ortiz & Sánchez, 2010). En el suelo las poblaciones microbianas se componen de comunidades diversas con capacidad de interactuar, tanto química como físicamente, con diversas sustancias conduciendo a cambios estructurales o a la degradación completa de dicha sustancia contaminante (Ramakrishnan et al., 2011).

Entre las comunidades microbianas, las bacterias y los hongos son los principales transformadores y degradadores de pesticidas, gracias a que producen enzimas extracelulares con gran habilidad. La degradación de plaguicidas catalizada por enzimas puede ser más efectiva que los métodos químicos existentes, por lo que estas son fundamentales en el modo de acción de muchos pesticidas (Ortiz et al., 2013).

Las enzimas están involucradas en la degradación de plaguicidas, tanto en el organismo diana, a través de mecanismos intrínsecos de desintoxicación y resistencia metabólica evolucionada, y en un entorno más amplio, a través de la biodegradación por microorganismos del suelo y el agua. (Ramesh et al., 2015). Las principales familias de enzimas implicadas en la degradación son las esterasas, glutatión S-transferasas (GST), citocromo P450, las hidrolasas, las fosfotriesterasas (PTE), las oxidorreductasas, las oxidasas de funciones mixtas (MFO) (Riya & Jagatpati, 2012).

Las hidrolasas son un amplio grupo de enzimas involucradas en la biodegradación de pesticidas, catalizan la hidrólisis de varias clases de pesticidas bioquímicos lo que las convierte en candidatos ideales para todas las estrategias de biorremediación (Ramesh et al., 2015). Se ha encontrado que las enzimas con esta actividad son responsables de la degradación del pesticida carbofurano, el cual puede ser transformado en el medio ambiente y se generan o acumulan diferentes metabolitos menor toxicidad o persistencia en el suelo, agua y sedimentos, principalmente (Yan et al., 2007).

Las fosfotriesterasas son un grupo importante de enzimas aisladas de diferentes microorganismos que hidrolizan y desintoxican los pesticidas organofosforados (Shen et al., 2010).

Las estererasas son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis sobre ésteres carboxílicos (carboxiesterasas), amidas (amidadas), ésteres de fosfato (fosfatasas), etc. Muchos insecticidas (organofosforados, carbamatos y piretroides) han asociado un éster carboxílico y las enzimas capaces de hidrolizar tal enlace éster son conocidas con el nombre de carboxilesterasas (Bansal, 2012).

Las oxidorreductasas son un amplio grupo de enzimas que catalizan la transferencia de electrones de una molécula (el reductor o donador de electrones) a otra (el oxidante o aceptor de electrones). Muchas de estas enzimas requieren cofactores adicionales, para actuar como donantes de electrones, electrón receptor o ambos. Las oxidorreductasas tienen aplicaciones en biorremediación, aunque su necesidad de cofactores complica su uso en algunas aplicaciones (Ramesh et al., 2015).

Las oxidasas de función mixta comprenden dos enzimas; citocromo P450 y NADPH-citocromo P450 reductasa, ambas proteínas de membrana son activas en el metabolismo de una amplia variedad de xenobióticos (Abass et al., 2012).

Las GST son un grupo de enzimas que catalizan la conjugación de componentes hidrofóbicos con el tripéptido glutatión. En esta reacción, el grupo tiol del glutatión reacciona con un lugar

electrófilo en el compuesto objetivo para formar un conjugado que pueda ser metabolizado o excretado, y están involucrados en muchas actividades fisiológicas celulares, como la desintoxicación de compuestos endógenos y xenobióticos, el transporte intracelular, biosíntesis de hormonas y protección contra el estrés oxidativo (Shi et al., 2012).

Por otra parte, las aplicaciones de la tecnología de DNA recombinante han permitido caracterizar genes de microorganismos responsables de la degradación de pesticidas, la mayoría de estos genes se han encontrado en los cromosomas, pero otros han sido hallados en plásmidos o transposones. Entre los genes identificados, se encuentra el (*gen opd*) identificado en bacterias, el cual cuenta con la capacidad de usar pesticidas organofosforados como fuente de carbono. Algunos otros genes con capacidad de degradación encontrados en bacterias son el *opaA*, *opdA*, *hocA*, *Phn*, *ophC2*, *Mpd*, entre otros. En hongos los genes con dicho potencial son A-*opd* y P-*opd* (Ortiz et al., 2013).

Biodegradación del carbofurano.

Las bacterias juegan un papel importante en la biodegradación de plaguicidas tóxicos en el ambiente, entre estos el carbofurano Chaudhry y Ali (1988) aislaron 15 cepas bacterianas a partir de suelo y las utilizaron como método biológico para degradar carbofurano, encontraron que este compuesto era la única fuente de nitrógeno o carbono para las bacterias que hidrolizan el carbofurano a carbofuran fenol.

Las vías de degradación del carbofurano propuestas en la base de datos de Biocatálisis y Biodegradación de la Universidad de Minnesota (Figura 3), describen como las bacterias pueden degradar el carbofurano en carbofuran-7-fenol y metilamina, hidrolizando el carbofuran-7-fenol a 3-(2-hidroxi-2-metilpropil) benceno-1,2-diol (DP-1), y luego degradar DP -1 en un metabolito rojo (DP-2). El carbofurano también puede ser hidroxilado en la posición 4 y 5 (Gao, Kane & Turnbull, 2008)

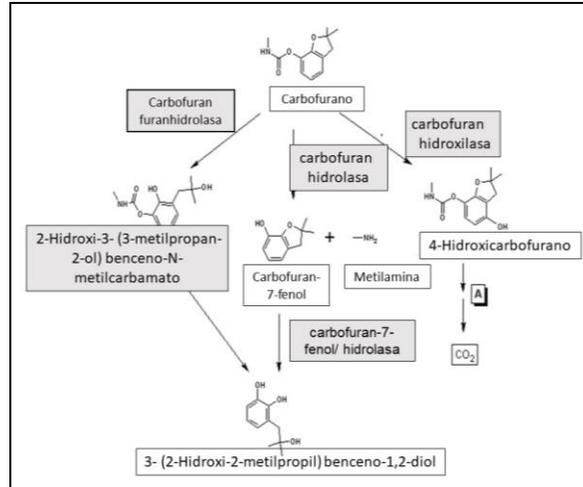


Figura 3. Vía de degradación del carbofurano por bacterias.

Base de datos de biocatálisis y Biodegradación de la Universidad de Minnesota. 2008.

En la literatura se reporta que los hongos también tienen la capacidad de degradar plaguicidas como el carbofurano y emplearlos como única fuente de carbono y/o de nitrógeno, y que este xenobiótico promueve el crecimiento de los microorganismos (Castellanos & Rache, 2013) la degradación fúngica del carbofurano (Figura 4) puede ocurrir a través de la hidroxilación en la posición tres y la oxidación a 3-Ketocarbofurano.

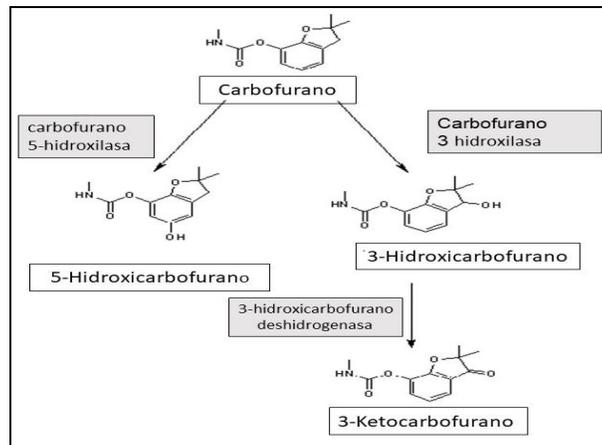


Figura 4. Vía de degradación del carbofurano por hongos.

Base de datos de biocatálisis y Biodegradación de la Universidad de Minnesota. 2008.

Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR).

Es una técnica bioanalítica que permite clasificar a los microorganismos en diferentes niveles taxonómicos, teniendo en cuenta el estado fisiológico del organismo analizado, ya que el espectro refleja la composición bioquímica de las células en estudio, generando una huella digital (Álvarez & Prieto, 2010). La FTIR ha ganado interés creciente en identificación microbiana, es una técnica rentable y permite una rápida y simple identificación de microorganismos en un tiempo de 24 horas (Wenning & Scherer, 2013). La absorción de luz infrarroja por compuestos celulares da como resultado una huella química, espectro se puede identificar y comparar con las bases de datos espectrales. Dada la disponibilidad de bases de datos bien compuestas, se ha demostrado FTIR es una técnica confiable a nivel de género y especie (Wenning et al., 2014).

La técnica está basada en el uso de radiación infrarrojo (IR) que cambia el comportamiento vibracional de las moléculas repartiendo la energía, cambiando su vibración y modo de rotación. La radiación IR, se puede obtener a partir de la emisión térmica de una fuente apropiada que excita ciertos grupos moleculares y la vibración resultante del estado excitado solo ocurre en longitudes de onda fijas, esto da como resultado la absorción de energía de frecuencias correspondiente al modo molecular de vibración de la molécula correspondiente o grupo químico. La radiación IR comúnmente abarca la radiación electromagnética cuya frecuencia se encuentra entre $14,300$ y 20 cm^{-1} , pero las frecuencias vibratorias más útiles de la mayoría de las moléculas corresponden al espectro IR medio (entre 4000 y 400 cm^{-1}) (Álvarez, Mouwen, López & Prieto, 2011).

El perfil espectral proporciona información sobre macromoléculas importantes como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos presentes en las células y se tienen en cuenta cinco ventanas. La primera entre 3000 y 2800 cm^{-1} (w_1), influenciado por grupos funcionales de ácidos grasos de membrana y por algunas vibraciones de cadena lateral de aminoácidos. La segunda entre 1800 y 1500 cm^{-1} (w_2), relaciona la amida I y los grupos amida II que pertenecen a proteínas y péptidos. Estos picos intensos proporcionar información global sobre la estructura de la proteína. Las bandas cercanas a 1740 cm^{-1} indican las vibraciones de estiramiento de los grupos funcionales éster en lípidos, también pueden presentarse absorciones de ácidos nucleicos debido a la estructura de las bases heterocíclicas del ADN o ARN.

La ventana entre 1500 y 1200 cm^{-1} (w3), es una región mixta influenciada por proteínas, ácidos grasos y compuestos que llevan fosfato. La ventana entre 1200 y 900 cm^{-1} (w4), revela la aparición de carbohidratos y polisacáridos en la pared celular pero también la influencia de ácidos nucleicos y la ventana entre 900 y 700 cm^{-1} (w5), se conoce como una región con patrones espectrales débiles muy específicos del anillo aromático vibraciones de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano, fenilalanina) y nucleótidos (Álvarez et al., 2011) (Lecellier et al., 2015).

Espectroscopia Ultravioleta Visible.

Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica analítica muy versátil y capaz de detectar casi cualquier molécula, implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible, utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano. En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas (Venton, 2018).

UV-Vis se puede utilizar de una manera cualitativa, para identificar grupos funcionales o confirmar la identidad de un compuesto haciendo coincidir el espectro de absorbancia. También puede ser utilizado de manera cuantitativa, pues permite determinar la concentración de una solución, para ello es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias como las tablas de coeficientes de extinción molar o, con más exactitud, determinándolo a partir de una curva de calibración. La espectrometría UV-Vis se utiliza con mayor frecuencia en forma cuantitativa para determinar las concentraciones de especies absorbentes en solución, usando la Ley de Beer-Lambert (Mäntele & Deniz, 2017).

$$A = \log_{10} (I/I_0) = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Ecuación 1

(Beer & Lambert, 1760)

Donde A es la absorbancia medida, I_0 es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda, I es la intensidad de transmisión, b la longitud de ruta a través de la muestra, y C la concentración de las especies absorbentes. Para cada especie y longitud de onda, ϵ es una

constante conocida como absorptividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular, y tiene como unidades $l/M * cm$ o, a menudo, $U/M * cm$ (Venton, 2018).

Método extracción dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

En las últimas décadas, las técnicas de preparación de muestras atrajeron mucha atención, debido a la necesidad de determinaciones precisas y rápidas de un número cada vez mayor de analitos a bajas concentraciones en matrices complejas. La preparación muestras es importante en todo proceso analítico, pues de ello depende el tiempo total requerido para completar el análisis, la calidad de los resultados y el costo del análisis. Durante el procedimiento, se debe concentrar el analito mientras se eliminan posibles interferencias, evitando así la degradación; otros aspectos importantes es que el método debe ser robusto, reproducible e independiente a las variaciones de la matriz de muestra (Hoff & Pizzolato, 2018).

La técnica MSPD ha demostrado ser eficiente y versátil para aislar varias clases de sustancias, como pesticidas, drogas, contaminantes y naturales compuestos, de una amplia variedad de muestras de animales y plantas. El procedimiento consta de tres pasos principales: I) La muestra se mezcla con el material dispersante en un mortero; II) el homogeneizado en polvo se transfiere a un cartucho de extracción en fase sólida y se comprime; III) se hace elución con un disolvente o disolvente adecuados y la ayuda de una bomba de vacío (Capriotti et al., 2015).

El éxito de MSPD como método de extracción se debe a su simplicidad al no requerir ningún tipo de instrumentación o equipo, además es flexible y robusto en comparación con otros métodos de preparación de muestras. Las condiciones de extracción son sencillas (es decir, la temperatura ambiente y la presión atmosférica) preservan los analitos de degradación y desnaturalización (Hoff & Pizzolato, 2018).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC / MS).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC / MS), es una técnica analítica para la caracterización, cuantificación e identificación de mezclas complejas de sustancias químicas. En ella se combinan las ventajas de dos técnicas: el alto poder de resolución

y la velocidad de análisis de la cromatografía de gases con la identificación positiva y análisis cuantitativos de la espectrofotometría de masas (Peter, 2017).

La (GC / MS) es una técnica instrumental, que comprende un cromatógrafo de gases (GC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS), esto lo hace ideal para el análisis de los cientos de compuestos de peso molecular relativamente bajo que se encuentran en los materiales ambientales. Para que un compuesto sea analizado por GC / MS debe ser suficientemente volátil y térmicamente estable. Las muestras generalmente se analizan como soluciones orgánicas, en consecuencia, materiales de interés (por ejemplo, suelos, sedimentos, tejidos, etc. El procedimiento consiste en inyectar la solución de muestra en la entrada cromatógrafo donde esta es vaporizada y barrida en una columna cromatográfica por el gas portador (generalmente helio). La muestra fluye a través de la columna y los compuestos que comprenden la mezcla de interés se separan en virtud de su interacción relativa con el recubrimiento de la columna (fase estacionaria) y el gas portador (fase móvil). La última parte de la columna pasa a través de una línea de transferencia calentada y termina en la entrada a la fuente de iones donde los compuestos que se eluyen de la columna se convierten en iones (Zhang et al., 2018).

En el paso de espectrometría de masas GC-MS, los compuestos que abandonan la columna de GC se fragmentan por impacto electrónico. Los fragmentos cargados se detectan y el espectro subsiguiente obtenido se puede usar para identificar la molécula. Los patrones de fragmentación son reproducibles y se pueden usar para producir mediciones cuantitativas (EAG Laboratories, 2018).

Esta técnica de detección ha sido empleada para analizar diferentes compuestos en muestras ambientales, resultando ser adecuada para el análisis de residuos de múltiples plaguicidas como organofósforados, carbamatos, tetrazina, triazol, imidazoles, piretroides y estrobilurinas, ya que proporciona alta selectividad y resolución de masas para lograr la detección química (Menezes, Neves & Pereira, 2010).

Capítulo III

Metodología

Diseño Metodológico

Área de estudio.

Las muestras de suelo se tomaron en la finca Villa Rica, Vereda San Agustín del Municipio de Mutiscua, provincia de Pamplona, ubicada a $07^{\circ}18'03''N$ y $72^{\circ}44'49''O$ a una altitud de 2800 msnm (Figura 5), dicho lugar se seleccionó por ser reconocido como productor de papa criolla desde hace aproximadamente treinta años. Según entrevista con los agricultores, estos cultivos han presentado diversos ataques de plagas como el gusano blanco y la polilla pequeña y por esta razón se ha requerido el uso carbofurano en sus presentaciones comerciales.

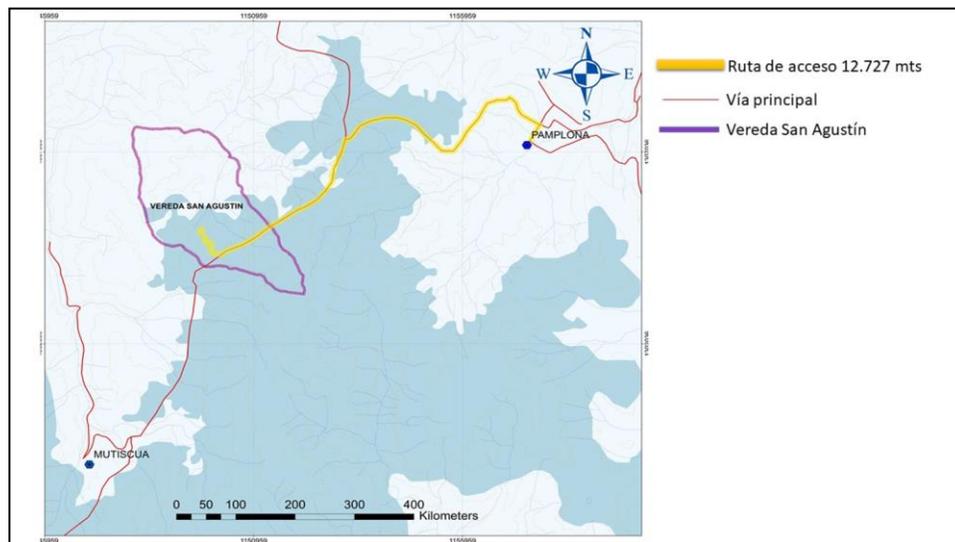


Figura 5. Área de estudio.

Fuente: Elaboración propia.

Muestreo de suelos.

Se realizó un muestreo aleatorio simple (M.A.S.) con muestras finitas, para ello se seleccionaron tres parcelas experimentales cada una con tamaño de una hectárea, cuyas variables fueron el tiempo de siembra y los periodos de fumigación con carbofurano. Adicionalmente, se

seleccionó una cuarta parcela conformada por una zona sin antecedentes de siembras, la cual se identificó como la parcela de control (Figura 6).

La toma de muestras de suelos se realizó teniendo en cuenta las indicaciones mencionadas en la guía de Corpoica, para esto se señalaron los puntos a muestrear haciendo un trazo en zig-zag, hasta cubrir toda el área de la parcela y evitando tomar muestras en cercanías de cercas, vallados, casas, carreteras, albercas.

En los sitios seleccionados, se removió la capa superior del suelo, luego se enterró el barreno hasta tomar los primeros 20 cm de suelo. El suelo que se recogió de cada parcela fue depositado en un recipiente con el fin de hacer una mezcla para crear una muestra homogénea y se almacenó en bolsas ziploc con cantidades de 1 kg. Posteriormente, las muestras fueron transportadas en neveras de icopor hacia el campus principal de la Universidad de Pamplona.

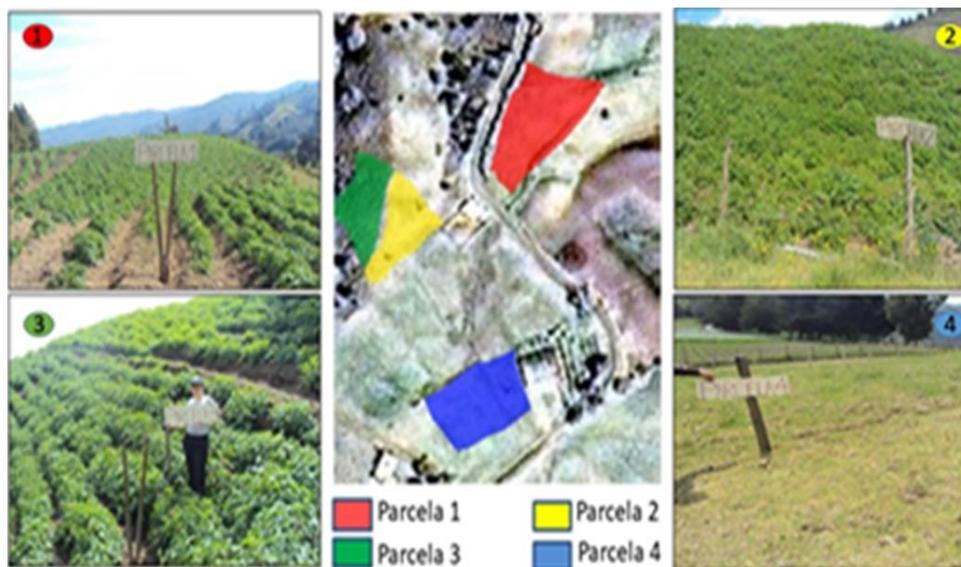


Figura 6. Distribución de las parcelas.

Fuente: Elaboración propia.

Análisis fisicoquímico y ambiental.

Como factor ambiental se tuvo en cuenta la temperatura, la cual se midió en el subsuelo a profundidades de 50 a 100 cm, utilizando un termómetro metálico de punción marca Lantelme. Dentro de cada parcela se establecieron tres puntos en los que se midió la temperatura durante las horas de la mañana, la tarde y la noche y de esta manera se obtuvo un promedio.

El análisis fisicoquímico del suelo se realizó en el laboratorio de control de calidad de la Universidad de Pamplona. Las muestras se procesaron de manera individual: tamizaje, homogenizado y cuarteo, posteriormente se realizó el análisis de suelos (tabla 1). Dichos parámetros se tuvieron en cuenta por estar relacionados con el proceso de biodegradación (Shukla, Singh & Sharma, 2010).

Tabla 1.

Análisis fisicoquímicos de los suelos cultivados con papa criolla S. phureja.

Análisis Físicoquímico	Método
pH	Electrométrico
Humedad	Gravimétrico
Fósforo	Bray II modificado
Materia orgánica	Walkley y Black
Capacidad de intercambio catiónico	Acetato de Amonio Normal y Neutro
Conductividad	Conductimétrico

Fuente: Elaboración propia.

Aislamiento de biota nativa.

Las muestras de suelo se homogenizaron con el fin de retirar residuos o fragmentos de roca mayores de 2 mm de diámetro. Se empleó un kilogramo de muestra por parcela para preparar los extractos que sirvieron como base en la elaboración de los medios de cultivo (Hamaky et al., 2005). Para el aislamiento de hongos se empleó agar papa dextrosa modificado (PDA) de Merck y para las bacterias agar Nutritivo modificado.

La preparación de inóculos se realizó diluyendo 11 g de suelo fresco en 99 ml de solución salina estéril al 0,85% manteniendo agitación constante. A partir de dicha suspensión se

realizaron diluciones seriadas y posteriormente sus respectivas siembras en placa (Fernández et al., 2006). Las cajas se incubaron a 25 °C durante 24 horas para bacterias y 72 horas para hongos, pasado este tiempo se hizo identificación de las colonias que crecieron.

Identificación de los aislamientos.

En los cultivos bacterianos, las colonias crecidas se separaron realizando siembras por aislamiento en agar nutritivo. 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. Se realizaron siembras en los medios selectivos Cetrimide, EMB, Makconkey, Manitol Salado y Mossel hasta obtener colonias bacterianas puras.

La identificación por pruebas bioquímicas se realizó por la técnica de batería convencional (Fernández, García, Sáenz & Valdezate, 2010) empleándose las pruebas de oxidasa, motilidad, citrato, TSI, Lía, úrea, gelatina, SIM, nitrato, rojo de metilo, Voges Proskauer, xilosa, arabinosa, sacarosa, maltosa, manitol, glucosa y fructosa.

Algunos aislamientos fueron identificados mediante pruebas rápidas utilizando el kit API 20 E. Con los resultados arrojados por ambos métodos se halló el porcentaje bioquímico de afinidad o identidad para cada microorganismo aislado, dicha relación se determinó teniendo en cuenta las tablas de identificación descritas por (Koneman, 2008).

En el caso de los hongos, las colonias crecidas fueron identificadas teniendo en cuenta las características fenotípicas macroscópicas como el color, aspecto de la colonia, formación de sinemas, producción y difusión de pigmentos. Para la identificación microscópica se aplicó el método de microcultivo y el procedimiento consistió en tomar una caja de Petri, la cual contenía en su interior un pitillo en triangulo como soporte para una lámina portaobjetos, todo lo anterior estéril. Luego se cortó con asa una porción de agar PDA de 1x1 cm colocándola sobre el portaobjetos, seguidamente, con un asa micológica estéril se tomó una porción del hongo, inoculándola en el centro del agar y se cubrió con una laminilla estéril. Las cajas se dejaron en cama húmeda estéril, durante 3-5 días a 25 ± 2 °C.

El microcultivo de cada uno de los hongos aislados se examinó al microscopio y se registraron datos como: ausencia o presencia de septos, pigmentos, fíbulas, somatogamia, ausencia o presencia de fialides, calmidosporas, ascas, basidios, esporangios, rizoides, conidióforos y conidias de acuerdo con (Barnett & Hunter, 1972; Carrillo, 2003).

Pruebas de tolerancia al carbofurano.

Para determinar la capacidad de los microorganismos de tolerar el pesticida carbofurano se utilizó el método de disco de antibiograma propuesto por (Franco & Orrego, 2013). Dicho procedimiento es similar a los antibiogramas empleados en la parte clínica para detectar patrones de resistencia a antibióticos (Leal, Álvarez, Cortes & Ovalle, 2014).

Cada cepa bacteriana se sembró por triplicado de forma masiva en cajas con agar Mueller Hinton (Merck), después de tres minutos de reposo y con ayuda de una pinza estéril se depositaron en cada caja cuatro discos de papel filtro estilizados, impregnados con tres concentraciones diferentes (50, 70 y 100 ppm) de la solución de Carbofurano 3G comercial, como control se usó un disco impregnado con agua destilada estéril. Las cajas se incubaron durante 24 horas y al cabo de este tiempo, se evaluó el crecimiento de cada bacteria, determinando la presencia de halos de inhibición.

En el caso de los hongos, el antibiograma fue realizado mediante el método adaptado de (Gandarilla, Galán, Arévalo, Elías & Quintero, 2013) mediante el cual se depositó 1 ml de suspensión de conidios de cada hongo, luego se distribuyó uniformemente en una placa de Petri con medio Muller Hinton y se dejó reposar durante una hora. Posteriormente se colocaron discos de papel filtro impregnados con el pesticida en las concentraciones a evaluar (50, 70 y 100 ppm). Se evaluó el área de inhibición del crecimiento micelial, así como la esporulación del hongo. El halo fue medido por periodos de 24 horas durante siete días desde el momento de inicio del experimento y calculándose el promedio del área. La esporulación se realizó mediante la cuantificación de los conidios a los siete días del inicio del antibiograma, empleando la cámara de Neubauer.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron por triplicado para cada uno de los microorganismos. La interpretación de los resultados tanto para bacterias como hongos, se realizó con base en las categorías establecidas por el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos [NCCLS] (2000), las cuales corresponden a: sensible (S), cuando el microorganismo es inhibido y se forman halos grandes; intermedia (I) cuando la concentración de carbofurano inhibe de forma mínima el crecimiento del microorganismo formando halos pequeños y resistente (R) para aquellos microorganismos que al no ser inhibidos no forman halos (Cantón et al., 2000).

Análisis de microorganismos por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR).

Preparación de muestras por liofilización.

Del total de aislamientos microbianos obtenidos se hizo la selección de tres bacterias y tres hongos tolerantes al carbofurano, y estos fueron caracterizados por (FT-IR). Para ello se inició con la liofilización de microorganismos, dicho procedimiento incluyó la preparación de microorganismos, realizando siembras masivas de cada cepa en agar nutritivo para las bacterias y PDA para los hongos. Una vez crecidos los microorganismos, se procedió a la separación de la biomasa mediante un lavado por suspensión usando solución de sacarosa al 10 % como medio de liofilización, pues este tiene propiedades licoprotectoras y ayuda a mantener la viabilidad celular tras el proceso de congelación.

La recolección se hizo en tubos eppendorf de 2.0 ml, los cuales fueron llevados a centrifugación con el fin de separar las células (Wessman et al., 2013), una vez separada la biomasa microbiana el sedimento fue transferido a pequeñas cajas de vidrio, en las que cada muestra fue extendida formando una capa plana. El proceso se realizó en un liofilizador LABCONCO modelo 74000 series, disponible en el laboratorio de maestría en ciencia y tecnología de alimentos de la Universidad de Pamplona. Las muestras se ubicaron en la parte central del equipo. Los parámetros de proceso incluyeron un preenfriamiento a -40 °C durante cuatro horas, seguido por una primera rampa de congelación a -30 °C durante cinco horas, pasando a una segunda rampa a -20 °C por cinco horas más y la tercera rampa a -10 °C por el

mismo tiempo, finalmente la temperatura se llevó a 0 °C, una vez cumplidas las 24 horas del proceso se procedió a retirar las muestras del equipo (OPS Diagnostica, 2017).

Identificación por espectroscopia FTIR.

Los espectros de los microorganismos se realizaron en el Laboratorio de Biocalorimetría de la Universidad de Pamplona, aplicando la técnica de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) acoplada con reflectancia total atenuada (ATR).

Las mediciones por espectroscopia ATR-FTIR se realizaron en un espectrofotómetro FTIR marca SHIMADZU modelo IR Prestige-21, provisto de un detector DLATGS (Deuterated L-Alanine Doped Triglycene Sulphate) y equipado con un accesorio ATR modelo MIRacle, marca Pike Technologies, con cristal de diamante. Los espectros se obtuvieron en la región del infrarrojo medio, con un barrido de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} , a una resolución de 4 cm^{-1} y 40 scans (Lecellier et al., 2015). Cada microorganismo se analizó por triplicado de manera independiente. La adquisición de los datos se realizó utilizando el software del equipo, IR Solution 2002.

Análisis de espectros.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el programa Origin pro-2017 versión de prueba, donde se realizó la corrección de línea base seguida por normalización de los espectros. Posteriormente, se realizó la identificación de picos y la asignación de los diversos grupos funcionales. El análisis cualitativo de los grupos funcionales presentes en las muestras se realizó mediante comparación de los espectros de infrarrojo reportados en la literatura.

Ensayos de biodegradación individual, a partir de solución acuosa.

Preparación de la solución estándar de carbofurano.

El carbofurano usado durante este trabajo fue el producto: 32056 de SIGMA-ALDRICH, con una masa molar de 221,25 g/mol y una pureza del 99,9%. A partir de este, se prepararon 10 ml de una solución patrón de carbofurano a 210 ppm, el producto fue diluido en agua y llevado a un baño ultrasonido Elma E60H durante diez minutos para acelerar la disolución.

Cuantificación del carbofurano por espectrofotometría UV/Vis.

La determinación de absorbancias para realizar la curva de calibración se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS marca Shimadzu modelo UV-2401 PC con software UV probe 2.1, el barrido fue programado en un rango de longitud de onda de 250 nm a 400 nm. Como reactor se emplearon celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico y se tomaron los valores de absorbancia a 272 nm, 275 nm y 279 nm. Las soluciones de carbofurano a partir de las cuales se realizó la curva de calibración fueron preparadas en concentraciones de 210, 105, 73.5, 44.1, 21 y 13.23 partes por millón.

Se calculó el coeficiente de extinción molar junto con la ecuación de la recta para cada longitud de onda. Los valores obtenidos en el R^2 permitieron determinar que la absorbancia a 275 nm era la más precisa para establecer la cinética de degradación del carbofurano por espectroscopia UV-Vis.

$$Y=0,013x+0,0198$$

$$R^2=0,9968$$

Ecuación 2. Ecuación de la recta a una longitud de onda de 275 nm.

$$A_{275} = 0,13 \text{ Cppm} + 0,0198$$

$$\text{Cppm} = A_{275} - 0,0198$$

Ecuación 3. Ecuación para determinar la concentración de carbofurano en ppm.

Ensayos de biodegradación con bacterias.

Preparación de microorganismos: las tres bacterias seleccionadas para estos ensayos fueron sembradas de forma masiva por triplicado en agar nutritivo y llevadas a incubación a 25 °C durante 24 horas.

A continuación, la biomasa microbiana fue resuspendida en un medio de sales minerales MSM compuesto por (3 g K_2HPO_4 , 0.5 g KH_2PO_4 , 1.25 g $(NH_4)_2SO_4$, 10 mg NaCl, 100 mg

MgSO₄, 1 mg FeSO₄ 7H₂O y 200 mg EDTA por litro) y se llevó nuevamente a incubación. Después de 72 horas dicha biomasa fue recuperada mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 5 minutos, y se ajustó la concentración la cual se determinó por espectrofotometría en un equipo marca HACH DR 3800, a una densidad óptica de $0,500 \pm 0,005$ a 625nm (Castellanos et al., 2013). Para estos ajustes se tuvo en cuenta la escala de McFarland patrón 0,5 el cual según el estándar corresponde a una concentración bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (McFarland latex de Hardy Diagnostics, 1996).

Para los ensayos de degradación se construyeron unos reactores biológicos que consistían en Erlenmeyer de 500 ml estériles, totalmente cubiertos con papel aluminio para evitar la fotodegradación del carbofurano, cada uno de ellos cerrado de forma hermética con una pequeña manguera dentro y al final de está unida una jeringa de 5 ml a través de la cual se tomaron diariamente las muestras a analizar.

Para cada bacteria se realizó el montaje de degradación por triplicado. Los biorreactores contenían 50 ml de medio de sales minerales (MSM), carbofurano a una concentración final de 100 ppm y la bacteria a una concentración de 1×10^5 UFC /ml. Cada bacteria analizada incluyo dos controles, el control positivo correspondiente a 50 ml de medio MSM con carbofurano en una concentración final de 100 ppm, y el control negativo con 50 ml de MSM inoculado con la bacteria a una concentración de 1×10^5 UFC/ml (Figura 7). Todos los ensayos se incubaron a 25°C y se mantuvieron en agitación constante a 90 rpm en shaker de agitación totalmente cubiertos de la luz durante quince días (Mendoza et al., 2011).

Una vez preparados los ensayos de degradación se inició la toma de cinco ml de muestra cada 24 horas hasta completar siete días y luego los días diez y quince. Las muestras se transfirieron a tubo falcón de 15 ml estéril y se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos para separar el paquete celular del sobrenadante.

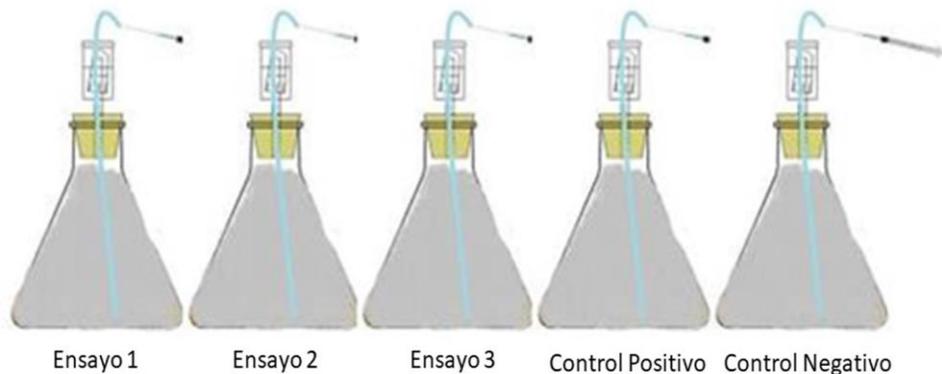


Figura 7. Montajes para biodegradación por bacterias

Fuente: Elaboración propia.

El precipitado se utilizó para la cuantificación del crecimiento bacteriano aplicando el método de conteo en placa. Para ello se prepararon diluciones seriadas 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000 de la suspensión anterior hasta un volumen final de 5 ml. Se depositó 1,0 ml de cada dilución en cajas de Petri estériles por triplicado, luego se agregó el agar SPC en un volumen aproximado de 20 ml. La muestra y el agar se homogenizaron y las placas se llevaron a incubación a 25 °C en posición invertida; después de 24 horas se realizó el conteo en las placas que tuviesen entre 25 a 250 colonias (Camacho et al., 2009).

El análisis de la degradación del carbofurano se realizó a partir del sobrenadante, el cual inicialmente fue filtrado a través de una membrana estéril Whatman con tamaño de poro de 0,2 μm . Posteriormente, se realizó el análisis por espectrofotometría UV/Vis a una longitud de onda de 275 nm y como blanco se usó medio MSM (Mendoza et al., 2011). La concentración se estimó teniendo en cuenta la ecuación de la recta que se obtuvo tras el análisis del carbofurano a diferentes concentraciones. Pasados quince días se pudo obtener la cinética de degradación para cada bacteria.

Ensayos de biodegradación con hongos.

Preparación de hongos: Cada hongo se sembró por triplicado de forma masiva en agar PDA y se llevó a incubación por 72 horas, luego se realizó el raspado de esporas empleando hisopos asépticos, estas fueron depositadas en tubos falcón de 50 ml estériles que contenían 10 ml de

Buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 compuesto por (1,1 gr/l K_2HPO_4 , 0,32 gr/l KH_2PO_4 y 8,5 gr/l NaCl).

La concentración de conidios/ ml se estableció por recuento en cámara de Neubauer, para ello fue necesario hacer una dilución factor 2 es decir que un volumen inicial de 5 ml se llevó hasta un volumen final de 10 ml, luego se filtró para eliminar los residuos del medio de cultivo y se procedió con el montaje de la cámara para el conteo. El número de conidios o células por ml se calculó según la ecuación 4 (Bustillo, 2010).

Las suspensiones de hongos se ajustaron a una concentración de 1×10^6 .

$$\text{Número total de células} = \frac{\text{No de células} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4}{4}$$

Ecuación 4. Para calcular la concentración celular de hongos.

En los ensayos de degradación del plaguicida empleando hongos se aplicó la metodología de Mendoza et al., (2011) con algunas modificaciones. Los biorreactores consistieron en Erlenmeyer de 100 ml forrados con papel aluminio para evitar la fotodegradación del carbofurano. Por cada hongo se trabajaron diez unidades experimentales por duplicado (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D6, D7, D10 y D15) los cuales contenían 20 ml del buffer PBS, el carbofurano a una concentración final de 100 ppm y el hongo a una concentración final de 1×10^5 conidios/ml. Como control positivo se preparó un biorreactor con PBS mas carbofurano a 100 ppm, mientras que el control negativo solo llevaba el PBS junto al hongo a una concentración final de 1×10^5 . Todos los ensayos se mantuvieron en agitación constante a 90 rpm a una temperatura de 25 °C; entre los días 0 al 7 se retiró un reactor por días, los demás en el día 10 y 15 (Figura 8).



Figura 8. Montajes de degradación en hongos

Fuente: Elaboración propia.

La evaluación del crecimiento fúngico se realizó por gravimetría, determinándose el peso seco de la biomasa (Rodríguez et al., 2017), Para ello, el contenido de cada biorreactor fue llevado a filtración por membrana al vacío utilizando un equipo de filtración S&S con bomba al vacío marca Rocker modelo 400 y filtros de celulosa millipore tipo GS de $0,22 \mu\text{m}$. En la membrana se retuvo la biomasa y se dejó secar para luego tomar su peso a través de una balanza analítica, para así establecer la cinética de crecimiento por hongo.

El análisis de degradación se realizó a partir del filtrado, en este caso se hizo una nueva filtración empleando una membrana estéril tipo Whatman con tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$ y jeringas estériles, luego se hizo el análisis por espectrofotometría UV/vis a una longitud de onda de 275 nm usando como blanco el PBS. Todas las pruebas se hicieron por triplicado, finalmente los datos fueron analizados, tomándose los promedios y desviaciones estándar para establecer la cinética de degradación de cada hongo frente al xenobiótico analizado.

Ensayos de biodegradación en suelo por parte del consorcio microbiano.

Preparación de Microorganismos.

Cada microorganismo se inoculó en solución salina estéril a 0,85% y se dejó crecer bajo incubación. A continuación, se realizaron los ajustes de concentración, para las bacterias según la escala de McFarland patrón 0,5 correspondiente a una concentración de $1,5 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ y para los hongos por conteo en cámara de Neubauer, ajustando la concentración a $1 \times 10^6 \text{ conidios/ml}$.

Seguidamente, en tubos falcón estériles se prepararon 10 ml de la mezcla de microorganismos dejando cada uno de ellos a una concentración final de 1×10^5 células por mililitro.

Preparación de carbofurano.

Se preparó una solución patrón de carbofurano SIGMA-ALDRICH, para ello se tomó parte del producto químico con la ayuda de una microespatula, se depositó en el fondo de un balón aforado de 10 ml y se registró el peso, luego se adiciono el solvente hexano acetona 8:2. La homogenización de la mezcla se realizó en baño ultrasonido Elma E60H. A partir de esta solución se prepararon un total de seis muestras a diferentes concentraciones y se realizó la curva de calibración.

Montaje de experimentos.

La metodología empleada se basó en el trabajo: Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para la determinación de carbofurano en suelos (Chaparro et al., 2017). Para ello, el suelo fue tomado de los cultivos de papa criolla *Solanum phureja* en la vereda San Agustín, se dejó secar y se tamizó por malla número 10 (2 mm), luego se sometió a esterilización en autoclave a 115 libras de presión durante 15 minutos. Seguidamente, en cajas de Petri pequeñas se depositaron 0,2 gramos de dicho suelo, para un total de 24 cajas.

Para evaluar la degradación se tomaron doce cajas y en ellas el suelo fue dopado con carbofurano a 150 ppm y el consorcio microbiano a una concentración de 1×10^5 células por ml, cada tres días durante quince días se retiraban las cajas para los respectivos análisis, estos ensayos se hicieron por duplicado. Las otras cajas se usaron como controles; seis de ellas se doparon solo con el microorganismo y las restantes solo con carbofurano a 150 ppm (Figura.9).



Figura 9. Montaje de degradación en suelo

Fuente: Elaboración propia.

Extracción de carbofurano por el método dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

Para el proceso de extracción, el contenido de las cajas fue transferido a un mortero de ágata para ser macerado y homogenizado junto con 0,8 gramos de silica gel como fase estacionaria, dicha mezcla fue llevada a una jeringa desechable de 5 ml, que contenía en su interior una capa de algodón y sulfato de sodio anhidro seco hasta un ml; por último, se colocó otra capa de algodón, se compactó y se eluyó con 5ml del disolvente hexano-acetona 8:2 (Figura. 10) finalmente se concentró a 2 ml (Chaparro et al., 2017).

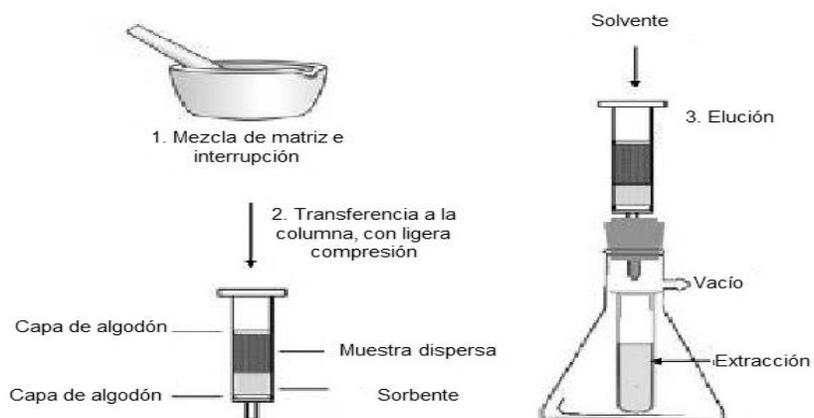


Figura 10. Procedimiento para la extracción de carbofurano por MSPD.

Capriotti et al., 2010

Cuantificación de carbofurano por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

Se utilizó un Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas modelo QP2010ULTRA marca SHIMADZU con puerto de inyección SPL1 y una columna Agilent DB-5MS (5% Fenil-metilpolisiloxano) con 30m x 0,25mm de diámetro y 0.25um de espesor. El gas portador empleado fue helio (99,995%) a un flujo de 2 ml/min, la temperatura del inyector se mantuvo en 250 °C.

La rampa de calentamiento inició en 120°C y se mantuvo a esta temperatura por dos minutos; a continuación, se aumentó a razón de 30 °C/min hasta 200 °C, por último, se aumentó a razón de 8 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 226,5 °C. El tiempo de análisis cromatográfico fue de 7,98 minutos, el carbofurano se detectó a los 6,2 minutos. Los resultados del espectro de masas fueron analizados y comparados con el espectro de masas para carbofurano publicado por Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST,) para tener total certeza que se trataba del compuesto de interés.

Procesamiento y análisis de datos.

En todos los experimentos se trabajaron controles y repeticiones de los ensayos. Los resultados de los parámetros fisicoquímicos se promediaron para obtener un valor final. El análisis de los resultados de aislamiento de microorganismos y tolerancia al carbofurano, se realizó de manera cualitativa según lo observado en los ensayos por triplicado. En la identificación de microorganismos por FTIR también se hizo un análisis cualitativo de los grupos funcionales encontrados.

Para los resultados de los ensayos de degradación individual, se establecieron los promedios y desviación estándar a las cinéticas de crecimiento microbiano y los ensayos de degradación. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza para la degradación de los microorganismos, trabajándose el anova de un factor, el procesamiento de datos se realizó en el software Statistix 10.

Análisis estadístico de la degradación individual en solución acuosa.

El análisis estadístico de estos resultados se realizó por ANOVA de una vía, pues este permite comparar si los porcentajes promedio de degradación de carbofurano son iguales o no por parte de los diferentes microorganismos (bacterias y hongos).

El modelo para este tipo de diseño corresponde a:

$$X_{ij} = \mu + T_i + E$$

Ecuación 5. Modelo para el análisis de varianza

Donde:

X_{ij} : Representa la respuesta del porcentaje promedio de degradación del pesticida carbofurano en diferentes microorganismos.

μ : Representa el promedio global del experimento, llevado a cabo con diferentes microorganismos.

T_i : Representa el efecto de la concentración de carbofurano en diferentes microorganismos.

ε : Es el error experimental.

El contraste de hipótesis a probar es el siguiente:

H_0 : $\mu_B = \mu_P = \mu_S$ (concentración promedio de carbofurano es igual en las diferentes bacterias).

H_1 : $\mu_B \neq \mu_P \neq \mu_S$ (concentración promedio de carbofurano es diferente en las diferentes bacterias).

De la misma manera para los hongos se tiene el siguiente contraste de hipótesis:

H_0 : $\mu_A = \mu_M = \mu_T$.

H_1 : $\mu_A \neq \mu_M \neq \mu_T$.

Los análisis cromatográficos se evaluaron realizando las respectivas integraciones del pico de carbofurano y con las áreas se calcularon las concentraciones. Todos los datos fueron analizados en el software origin 2017, versión de prueba.

Capítulo IV

Presentación e Interpretación de Resultados

Análisis fisicoquímico y ambiental

Los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros fisicoquímicos y ambientales realizados al suelo de las parcelas experimentales y la parcela control, se encuentran registrado en la tabla 2.

Tabla 2.

Parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de suelo.

	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Parcela 4 control
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
CIC meq/100 gr muestra	14,46	12,14	13,16	2,53
Conductividad µS/cm	124,3	572,0	278,0	157,1

Fuente: Elaboración propia.

Aislamiento e identificación de la biota nativa

Los sucesivos repiques de las cepas bacterianas aisladas, permitieron la separación de colonias. En la tabla se indican la morfología de los diversos aislamientos.

Tabla 3.

Caracterización de los aislamientos microbianos.

CEPA	Tinción de Gram	Forma	Crecimiento en medio selectivo	Morfología de las colonias
CEPA 1	Positivo	Bacilo con esporas	Mossel	Blancas y rizoides
CEPA 2	Negativo	Bacilo	EMB MacConkey	Brillo metálico Rojas con halo turbio, forma circular
CEPA 3	Negativo	Bacilo	MacConkey	Pigmento rojo intenso característico.
CEPA 4	Negativo	Bacilos	Cetrimide	Colonias redondas de pigmento amarillento en agar nutritivo y tono casi verde en Cetrimide.
CEPA 5	Negativo	Bacilo	EMB MacConkey	Rosadas y mucosas Rosadas y mucosa con bordes ondulados.
CEPA 6	Negativo	Bacilo	MacConkey	Colonias ligeramente pigmentadas de amarillo-verde.
CEPA 7	Negativo	Bacilo	EMB MacConkey	Incoloras transparentes

Fuente: Elaboración propia.

Las cepas se identificaron por método convencional bioquímico y pruebas rápidas API 20 lo que permitió determinar el porcentaje de afinidad para los siete géneros bacterianos obtenidos (tabla 4).

Tabla 4.

Bacterias aisladas e identificadas a partir del suelo.

CEPA	Microorganismo identificado	Porcentaje de afinidad
1	<i>Bacillus mycoide</i> (Ferdinand Cohn)	98,00%
2	<i>Escherichia coli</i> (Theodore von Escherich)	97,90%
3	<i>Serratia</i> sp. (Fort Detrick)	94,73%
4	<i>Pseudomonas</i> sp. (Walter Migula)	89,47%
5	<i>Klebsiella</i> sp. (Trevisan)	89,47%
6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Palleroni y Bradbury)	80,95%
7	<i>Salmonella</i> sp. (Theobald Smith)	78,90%

Fuente: Elaboración propia.

Las morfologías detalladas a nivel microscópico y macroscópico para los hongos (tabla 5), permitió la identificación de los géneros *Absidia*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cunnigamella*, *Fusarium*, *Mucor* y *Trichoderma*. En la parcela control se encontraron los géneros *Alternaria*, *Emericella* y *Mucor*.

Tabla 5.

Características de los hongos aislados en agar PDA.

Hongos	Características microscópicas	Características Macroscópicas
<i>Mucor</i> sp. (Georg Fresenius)	Hifas gruesas y aseptadas, con esporangios redondos. Esporangiosporos ramificados sin rizoides y columnela ovoide.	Colonias algodonosas que se tornan de gris con el tiempo, alcanzando la superficie del agar, reverso de color amarillo pálido.
<i>Fusarium</i> sp. (Link ex Grey)	Fialides y macroconidias fusiformes con septos transversales, microconidias elipsoidales acumuladas en la punta de la fialide formando falsas cabezas. Hifas hialinas septadas y delgadas.	Colonias algodonosas y planas de color blanco. Reverso con pigmento de color naranja.

<i>Trichoderma sp.</i> (Persoon)	Conidióforos erectos hialinos ramificados. Fialides en forma de botella. Colonias unicelulares subglobosas hialinas.	Colonias blancas que con el tiempo se tornan de verde en la superficie, por el reverso presentan coloración amarilla.
<i>Alternaria sp.</i> (Nees)	Hifas septadas, ramificados de color café. Cadenas de conidias con tabiques transversales, longitudinales y oblicuos.	Colonias planas y lanosas que con el tiempo se vuelven gris y negro algodonoso. Por el reverso se produce un pigmento marrón.
<i>Absida sp.</i> (Van Tieghem)	Hifas hialinas gruesas y aseptadas con esporangiosporas hialinas. Esporangióforo ramificado.	Colonias algodonosas color gris, con micelio aéreo que cubre la caja de Petri.
<i>Cladosporium sp.</i> (Link)	Hifas finas, septadas y ramificadas. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios cilíndricos, conidios en cadena.	Colonias color marrón y aterciopelado.
<i>Aspergillus sp.</i> (P. A. Micheli)	Tienen hifas tabiculares y conidióforos lisos de pared gruesa cuya cabeza está localizada en el extremo de un hifa, compuesta por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella directamente insertadas sobre la vesícula. De las fiálides se desprenden las esporas (conidios) Conidios cafés, ornamentados con verrugas y crestas esféricas.	Colonias de color negro y granuloso, plano e ilimitado. Por el reverso no se observa pigmento.
<i>Cunninghamella sp.</i> (Matr)	Hifas gruesas y aseptadas, columnela ovoide. Esporangiosporas redondas, esporangiolas ubicadas de forma radiada alrededor de la columnela similar a una flor.	Colonias algodonosas de color blanco con crecimiento rápido hasta alcanzar la superficie de la caja. Por el reverso presenta color blanco.

<i>Emericella sp.</i> (Eidam) Vuill.	Cabezas conidiales biseriadas; radiales en columnas poco compactas, vesículas hemisféricas, mótulas ocupando la mitad superior de la vesícula. Conidios esféricos rugosos. Cleistotecios globosos color rojo oscuro cuando maduran, rodeados de células de globosas.	Micelio de color amarillo con un exudado de color rojizo a marrón, las colonias aterciopeladas. Reverso amarillo
--	--	---

Fuente: Elaboración propia.

Tolerancia al carbofurano

En las pruebas de tolerancia al carbofurano se encontró que todos los géneros bacterianos exhibieron resistencia ante las concentraciones evaluadas 50, 70 y 100 ppm, ya que no aparecieron halos alrededor de las colonias (Figura 11).

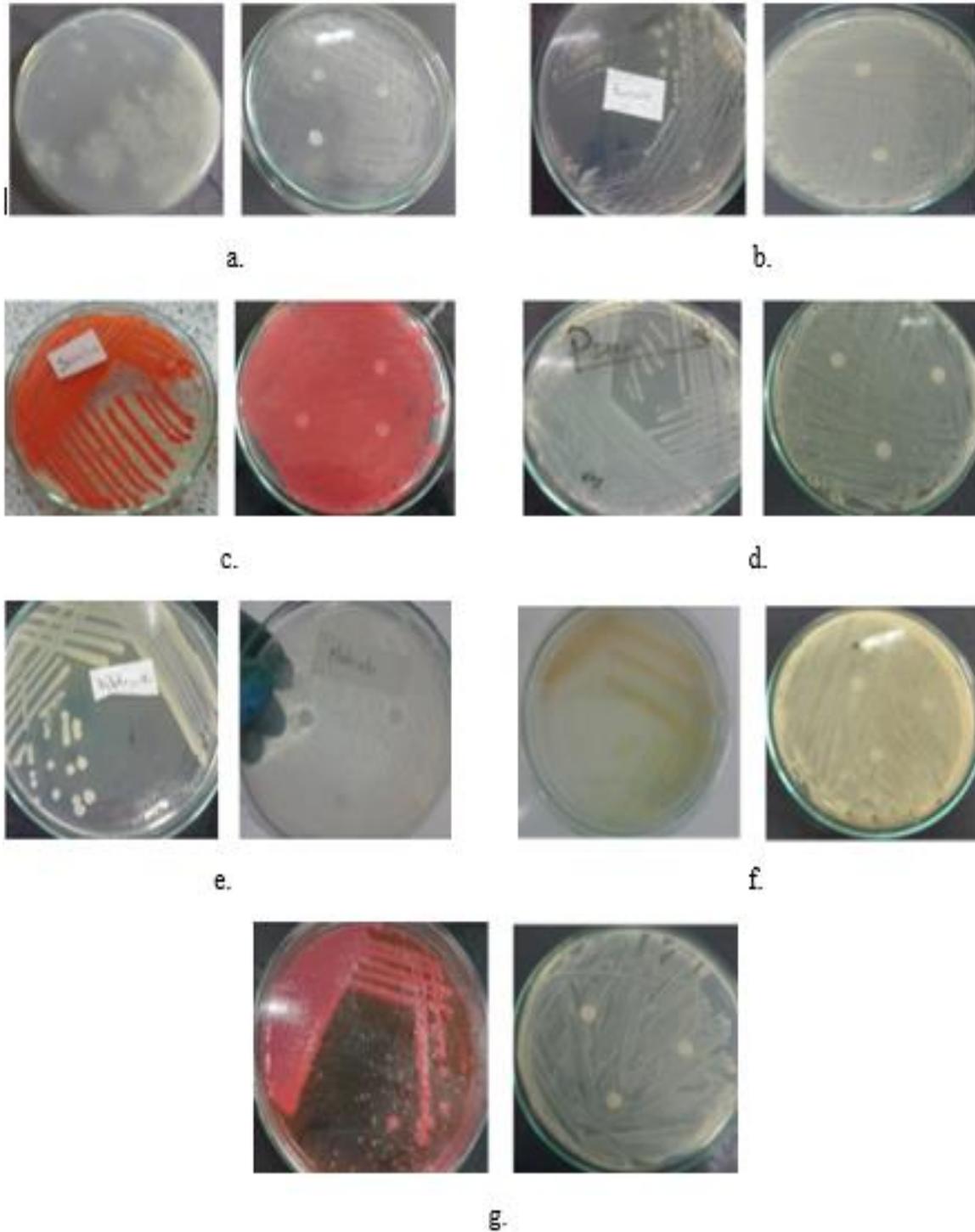


Figura 11. Bacterias aisladas y resistentes a diferentes concentraciones de carbofurano
a, *Bacillus mycoide* b, *E. coli* c, *Serratia* sp. d, *Pseudomonas* sp. e, *Klebsiella* sp. f, *Stenotrphomonas* sp.
g, *Salmonella* sp.

Fuente: Elaboración propia.

De los hongos identificados, siete presentaron tolerancia ante las diversas concentraciones del plaguicida, sin embargo, *Alternaria* sp. y *Emericella* sp. resultaron sensibles por lo que su crecimiento estuvo inhibido en las concentraciones de 70 y 100 ppm (Figura 12).

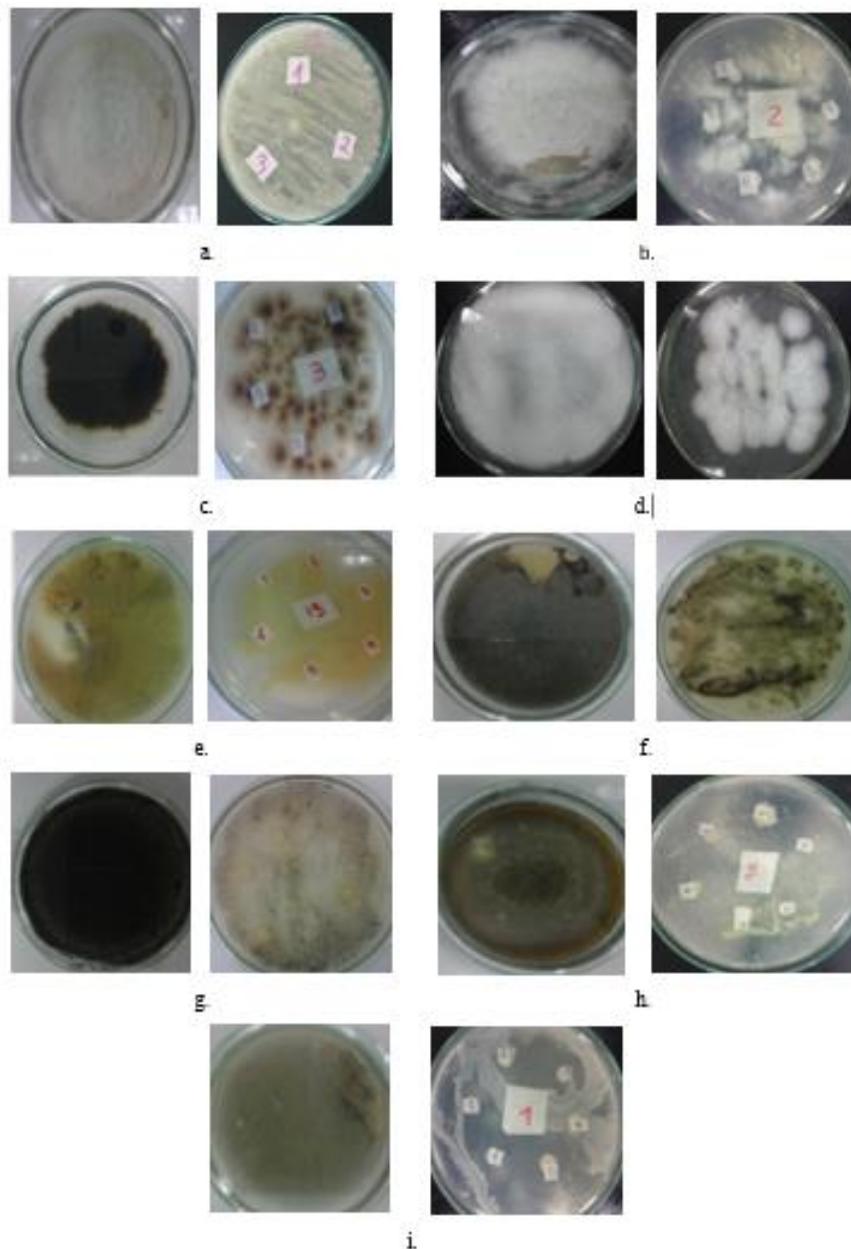


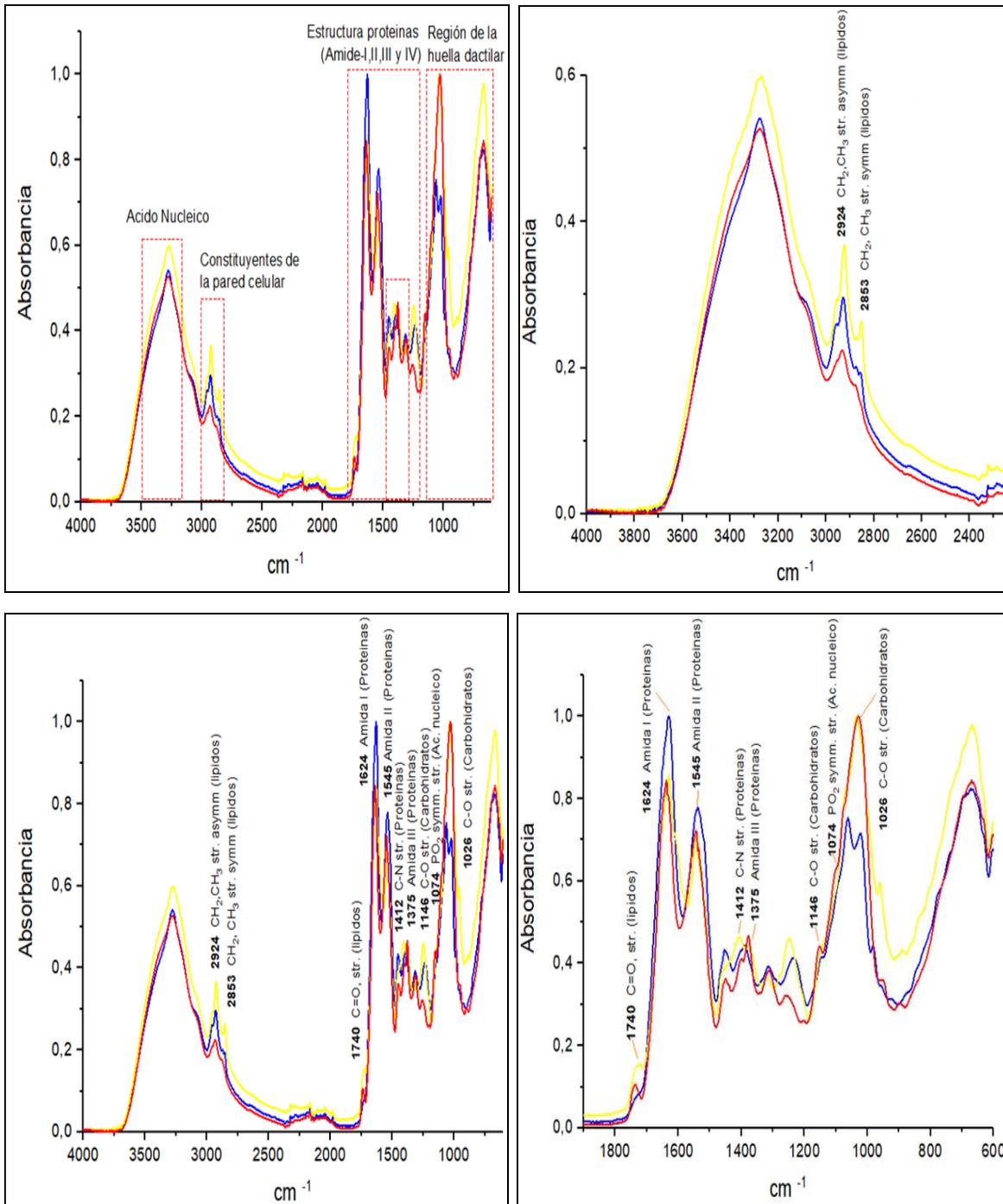
Figura 12. Hongos aislados, resistentes y sensibles al carbofurano.

a, *Trichoderma* sp. b, *Fusarium* sp. c, *Cladosporium* sp. d, *Cunninghamella* sp. e, *Mucor* sp. f, *Absidia* sp. g, *A. niger*. h, *Emericella* sp. i, *Alternaria* sp.

Fuente: Elaboración propia.

Identificación de microorganismos por espectroscopía FTIR

Las bacterias seleccionadas para ser analizadas por FTIR fueron: *Bacillus mycoide*, *Pseudomonas* sp. y *Serratia marcescens*. Los espectros de cada una de ellas fueron analizados, identificándose los rangos de las regiones espectrales cm^{-1} para la ventana de ácidos nucleicos (3500-3150), ventana de constituyentes de la pared celular (3000-2800), ventana de estructura de proteínas (1800-1190) y la denominada “verdadero *fingerprint*” o ventana de huella dactilar (1110-600). La comparación de los espectros de infrarrojo reportados en la literatura (figura 13) permitió obtener un análisis cualitativo y asignar los grupos funcionales presentes en las muestras a los diferentes picos encontrados. Los resultados de las frecuencias e intensidades de los picos encontrados para las bacterias se presentan en la (tabla 6).



— *Bacillus mycoide* — *Pseudomonas sp* — *Serratia marcescens*

Figura 13. Espectros FTIR en la región de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} .

Ventanas espectrales y asignación de los diferentes grupos bioquímicos a los picos encontrados.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6.

Comparación de la frecuencia e intensidad de los picos encontrados en los espectros FTIR de las tres bacterias.

<i>Bacillus mycoide</i>		<i>Pseudomonas sp.</i>		<i>Serratia marcescens</i>	
Frecuencia (cm ⁻¹)	Intensidad	Frecuencia (cm ⁻¹)	Intensidad	Frecuencia (cm ⁻¹)	Intensidad
3277	0,527	3279	0,542	3285	0,595
2934	0,224	2955	0,260	3267	0,599
1736	0,105	2928	0,296	2955	0,294
1638	0,843	2874	0,201	2924	0,368
1545	0,722	2857	0,193	2872	0,241
1449	0,362	1630	1,000	2853	0,264
1431	0,335	1537	0,779	1724	0,154
1400	0,410	1454	0,433	1719	0,155
1377	0,467	1387	0,444	1630	0,857
1314	0,382	1314	0,392	1578	0,564
1258	0,322	1234	0,413	1570	0,551
1204	0,261	1146	0,415	1545	0,706
1152	0,441	1063	0,752	1458	0,391
1028	1,000	1022	0,716	1406	0,465
961	0,360	982	0,443	1389	0,439
895	0,303	922	0,314	1375	0,441
669	0,845	671	0,823	1319	0,365
604	0,712	-	-	1248	0,460
-	-	-	-	1036	1,000
-	-	-	-	961	0,596
-	-	-	-	889	0,432
-	-	-	-	669	0,979
-	-	-	-	664	0,973

Fuente: Elaboración propia.

Los hongos; *Aspergillus niger*, *Mucor sp.* y *Trichoderma sp.* también fueron analizados por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) acoplada a ATR. A estos se les realizó el análisis espectral (Figura 14A) y asignación de grupos funcionales según los picos hallados (Figura 14). Los resultados de las frecuencias e intensidades de los picos encontrados en los hongos se presentan en la tabla 7.

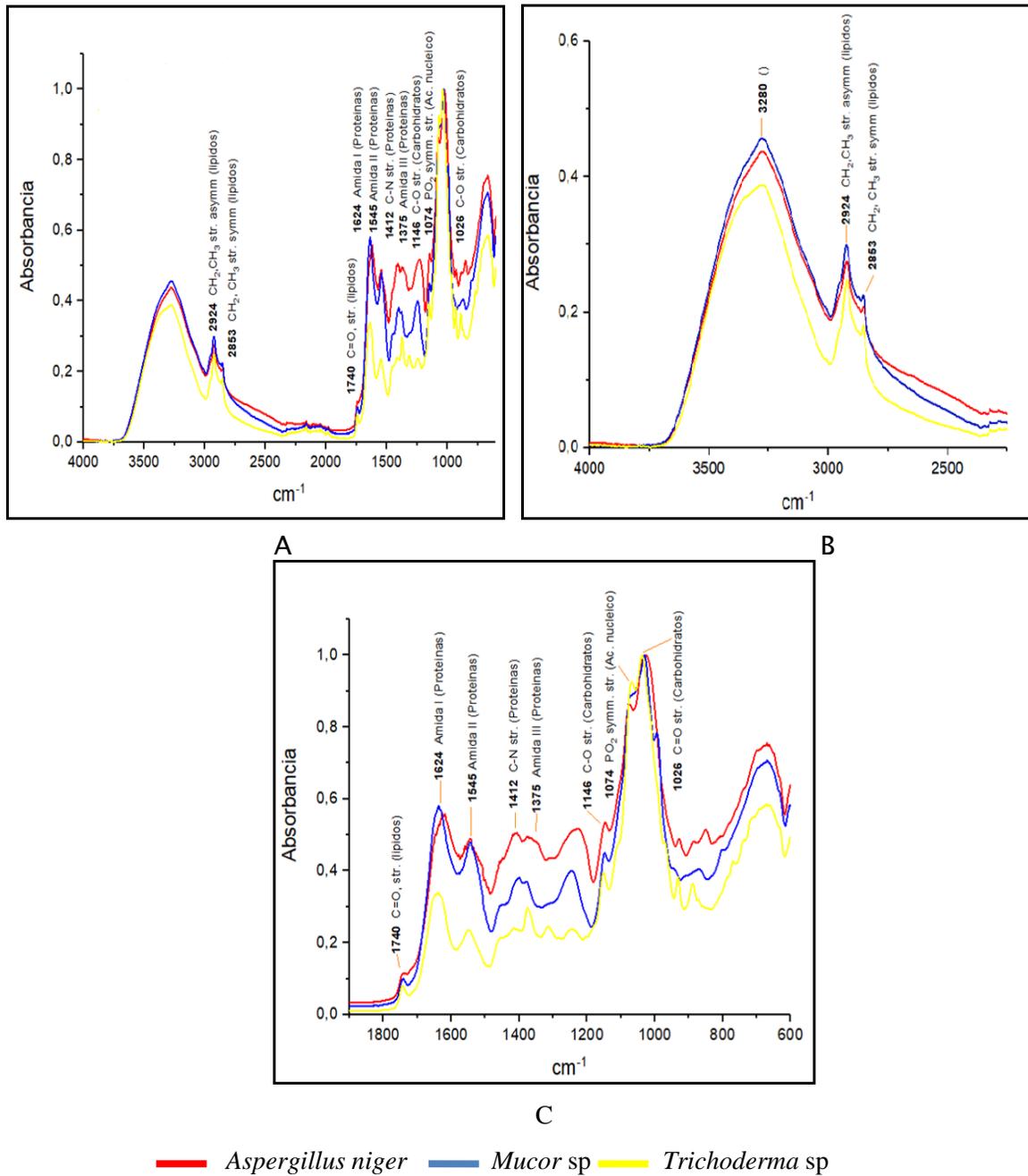


Figura 14. Espectros FTIR de los hongos.

(A). Asignación de grupos bioquímicos a los picos detectados entre 4000 cm^{-1} y 600 cm^{-1} , (B). Ampliación de la región de 3500 cm^{-1} y 2500 cm^{-1} , (C). Ampliación de la región desde 1800 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} y la respectivas asignaciones para *Aspergillus niger*, *Mucor sp* y *Trichoderma sp*.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7.

Comparación de la frecuencia e intensidad de los picos encontrados en los espectros FTIR de los tres hongos.

<i>Aspergillus niger</i>		<i>Mucor sp.</i>		<i>Trichoderma sp.</i>	
Frecuencia (cm ⁻¹)	Intensidad	Frecuencia (cm ⁻¹)	Intensidad	Frecuencia (cm ⁻¹)	Intensidad
3277	0,437	3277	0,457	3277	0,388
2924	0,275	2924	0,299	2922	0,248
2853	0,209	2855	0,225	2853	0,180
1741	0,113	1742	0,099	1744	0,080
1624	0,556	1638	0,581	1638	0,339
1545	0,490	1543	0,479	1551	0,236
1458	0,425	1449	0,306	1491	0,135
1412	0,505	1400	0,381	1414	0,240
1375	0,496	1379	0,371	1375	0,297
-	-	-	-	1314	0,245
1227	0,517	1246	0,400	1246	0,237
1146	0,534	1148	0,450	1152	0,394
1074	0,863	1074	0,889	1069	0,925
1026	1,000	1030	1,000	1038	1,000
-	-	993	0,783	970	0,478
928	0,488	-	-	932	0,382
885	0,481	872	0,405	889	0,364
808	0,495	802	0,458	-	-
669	0,755	669	0,707	669	0,585

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo con las frecuencias en las que se identificaron los picos (tabla 8), se realizó el análisis espectral de los modos de vibración en los diferentes rangos y la asignación de atribuciones biomoleculares para los microorganismos analizados.

Tabla 8.

Análisis espectral de los modos de vibración en los diferentes rangos y asignación de atribuciones biomoleculares.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Modo Vibracional	Atribución biomolecular
3285 -3267	N-H (amida A) de proteínas Región de estiramiento de O-H.	Polisacáridos y proteínas
2955- 2924	CH ₃ estiramiento asimétrico Estiramiento C-H alifáticos	Lípidos Ácidos grasos poca contribución de proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos
2879-2853	C-H estiramiento asimétrico de CH ₂ Estiramiento simétrico CH ₃ C-H estiramiento simétrico de CH ₂ en ácidos grasos:	Principalmente proteínas, con la poca contribución de lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos
1744-1719	Estiramiento de éster C=O:	Lípidos, triglicéridos.
1638-1624	Amida I de estructuras de lámina plegadas β	Proteínas (Amida I)
1551-1537	Curvatura NH ₂ , C = O, C = estiramiento N Amida II (curva de proteína N-H, estiramiento de C-N): a hélices	Proteínas Amida I y II
1491-1400	Deformaciones C-H de grupos CH ₂ o CH ₃ Alifáticos COO-simétrico C-H flexión, -CH ₃ estiramiento CH ₂ flexión:	Cadenas laterales de aminoácidos, ácidos grasos Lípidos
1379-1314		Proteínas, ácidos grasos y compuestos que llevan fosfato.
1258- 1146	PO ₂ - estiramiento asimétrico CO-O-C estiramiento asimétrico	Principalmente ácidos nucleicos con la poca contribución de los fosfolípidos. Glicopéptidos, ribosa, glucógeno y ácidos nucleicos
1074- 1000	Estiramiento simétrico PO ₂ estiramientos simétricos .C-O estiramiento: glucógeno	Ácidos nucleicos ADN, ARN y Fosfolípidos.
993-872	Estiramiento C-N + -C Estiramiento P-O-C, P-O-P C-N + -C estiramientos Xilo-oligosacáridos;	Ácidos nucleicos (fosfolípidos, pirofosfato de cadena de ribosafosfato) residuos de xilosa disustituidos
810-600	P-O estiramiento)	Principalmente ácidos nucleicos: Ácido dipicolínico (DPA)

Asignaciones según; Zdenek y Susanne. 2001. Garip, Cetin y Feride Severcan. 2009. Banyay et al., 2003; Cho-Smith et al., 2001; Dogan, Siyakus et al, 2007; Garip y col., 2007. Melin et al ., 2004; Robert et al ., 2005; Stuart, 1997).

Ensayos de biodegradación individual, a partir de solución acuosa

Los análisis del carbofurano por espectrofotometría UV/Vis, permitieron detectar el máximo de absorción a una longitud de onda de 275 nm (Figura 15).

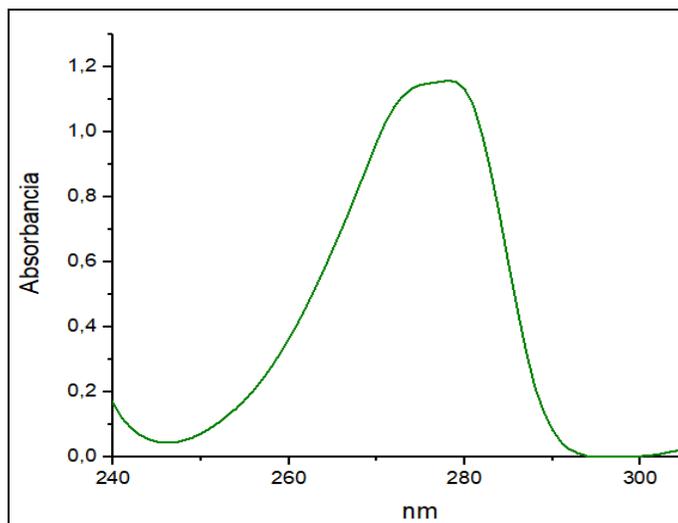


Figura 15. Espectro de absorción del carbofurano por UV/Vis.

Fuente: Elaboración propia.

La curva de calibración obtenida (Figura 16), permitió determinar la concentración del pesticida y su respectiva cuantificación y así evaluar la capacidad de degradación individual de dicha sustancia por parte de microorganismos nativos del suelo trabajado.

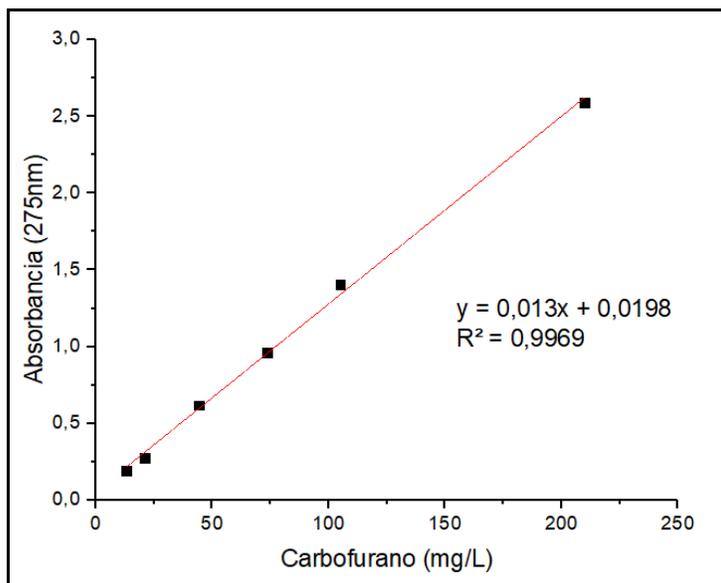


Figura 16. Curva de calibración para el carbofurano a una absorbancia de 275 nm por espectrofotometría

Fuente: Elaboración propia.

Ensayos de biodegradación con bacterias.

Las bacterias empleadas para evaluar su capacidad de degradación del carbofurano fueron: *Bacillus mycoide*, *Pseudomonas* sp. y *Serratia marcescens*, los ensayo realizados permitieron obtener la cinética de degradación de cada una de ellas (Figura 17).

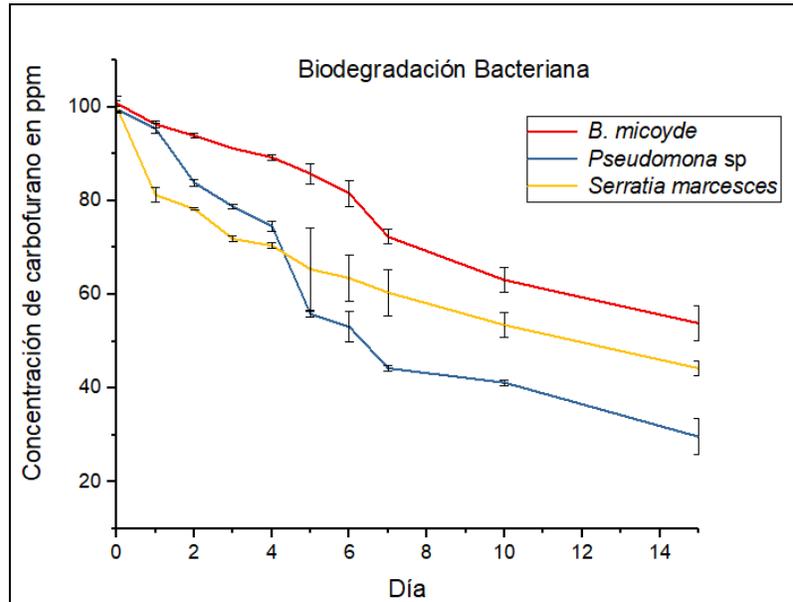


Figura 17. Cinética de degradación del carbofurano por parte de las bacterias, durante un periodo de quince días con una concentración inicial de 100 ppm.

Fuente: Elaboración propia.

Durante los quince días, también se evaluó el crecimiento bacteriano durante el proceso de biodegradación. Los conteos en placa permitieron establecer el número de UFC/ml, este análisis se realizó por triplicado para cada bacteria y a los resultados conseguidos se les estableció el promedio y desviación estándar, obteniendo finalmente la cinética de crecimiento individual (Figura 18).

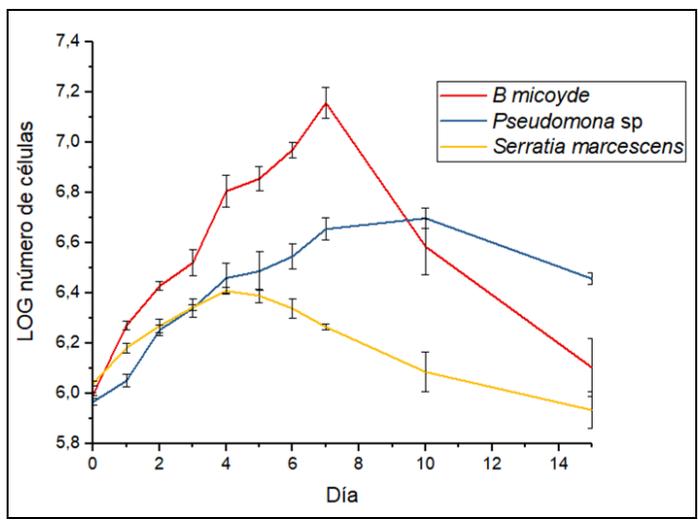


Figura 18. Cinética de crecimiento según la biomasa de las bacterias empleadas para los ensayos individuales de degradación del carbofurano durante un periodo de quince días en solución acuosa

Fuente: Elaboración propia.

Ensayos de biodegradación con hongos.

En la degradación de plaguicidas se trabajó con los hongos aislados: *Aspergillus niger*, *Mucor* sp y *Trichoderma* sp. De cada uno se obtuvo la concentración del carbofurano durante los ensayos de degradación, los cuales se hicieron por triplicado en un periodo de quince días, una vez calculados los promedios y la desviación estandar, se obtuvo la cinética de degradación por cada hongo (Figura 19).

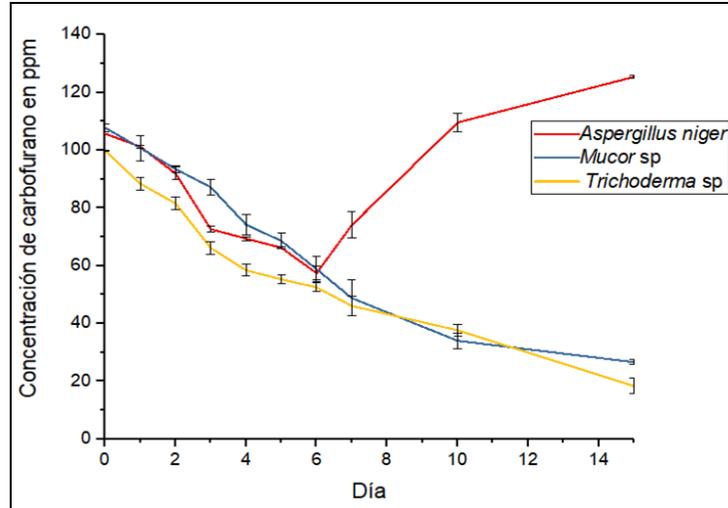


Figura 19. Cinética de degradación del carbofurano por parte de los hongos, durante un periodo de quince días con una concentración inicial de 100 ppm

Fuente: Elaboración propia.

Durante el proceso de degradación del carbofurano, se evaluó el crecimiento de la biomasa fúngica de los tres hongos a lo largo de los quince días del ensayo. Los resultados del peso seco obtenido se presentan en la Figura 20.

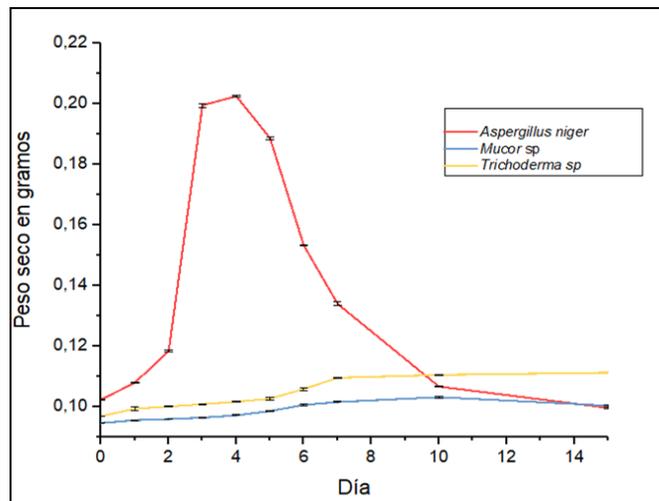


Figura 20. Crecimiento de los hongos durante los ensayos individuales de degradación del carbofurano en solución acuosa

Fuente: Elaboración propia.

Análisis estadístico de la degradación individual en solución acuosa.

En el análisis de varianza permitió identificar si estadísticamente la degradación por parte de las tres bacterias y hongos presentaba diferencias, así como el crecimiento microbiano durante el tiempo de realización de los ensayos (tabla 9).

Tabla 9.

Resultados de Análisis de varianza.

Nivel de significancia: 5 %				
VARIABLE	MICROORGANISMO	MEDIA	P-VALOR	INTERPRETACIÓN
Degradación de carbofurano por bacterias.	<i>Bacillus mycooides</i>	82,798	0.1111	No hubo diferencias en el % de degradación de carbofurano por las bacterias.
	<i>Serratia marcescens</i>	68,87		
	<i>Pseudomonas sp.</i>	65,13		
Crecimiento de la biomasa bacteriana	<i>Bacillus mycooides</i>	6,67	0,0307	Se presentaron diferencia en el crecimiento de las bacterias.
	<i>Serratia marcescens</i>	6,39		
	<i>Pseudomonas sp.</i>	6,22		
Degradación de carbofurano por hongos.	<i>Aspergillus niger</i>	71,631	0,5574	No hubo diferencias en el % de degradación de carbofurano por los hongos.
	<i>Mucor sp.</i>	70,062		
	<i>Trichoderma sp.</i>	60,49		
Crecimiento de la biomasa fúngica.	<i>Aspergillus niger</i>	0,14	0,0010	En el crecimiento de los hongos durante los ensayos de degradación de carbofurano, hubo diferencias.
	<i>Mucor sp.</i>	0,10		
	<i>Trichoderma sp.</i>	0,09		

Ensayos de biodegradación en suelo por parte del consorcio microbiano

Los resultados de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), mostraron que el patrón de carbofurano se detectaba a los 6,31 minutos (Figura 21).

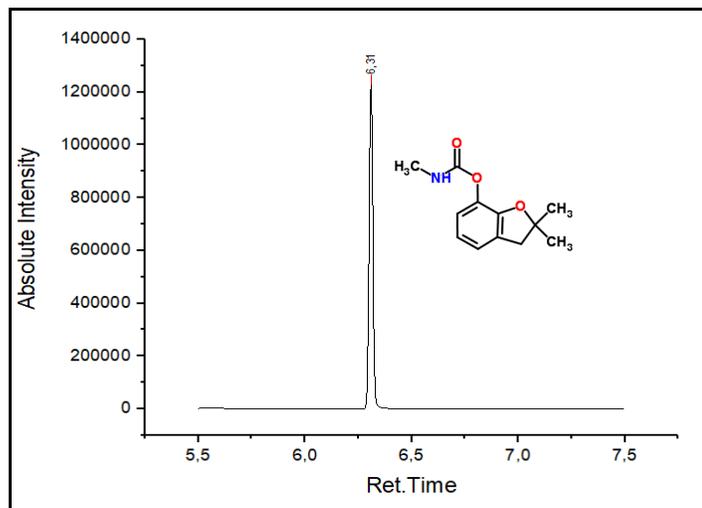


Figura 21. Cromatograma del patrón de carbofurano

Fuente: Elaboración propia.

A partir de la curva de calibración para la cuantificación del carbofurano por GC/MS (Figura 22) se preparó la solución a la cual se dopó el suelo a una concentración de 150 ppm.

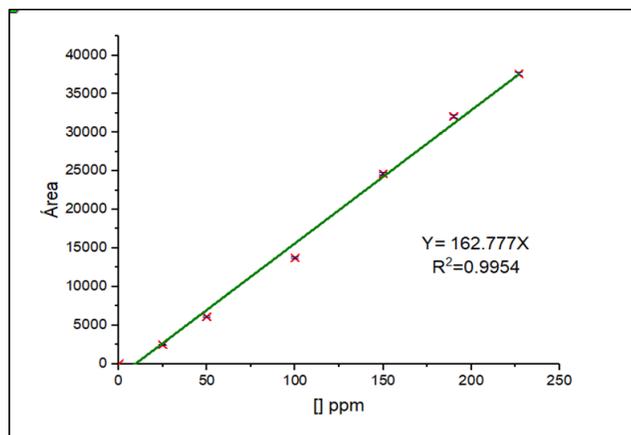


Figura 22. Curva de calibración para el carbofurano por (GC/MS).

Fuente: Elaboración propia.

Las extracciones de carbofurano por el método dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) que se realizaron a los suelos, permitieron realizar las cuantificaciones por cromatografía. El análisis de dichos datos sirvió para estimar las áreas de los picos (Figura 23), tanto en las muestras de los ensayos de degradación que contenían la mezcla de los seis microorganismos empleados en los ensayos individuales, y también en los controles de carbofurano y microorganismos.

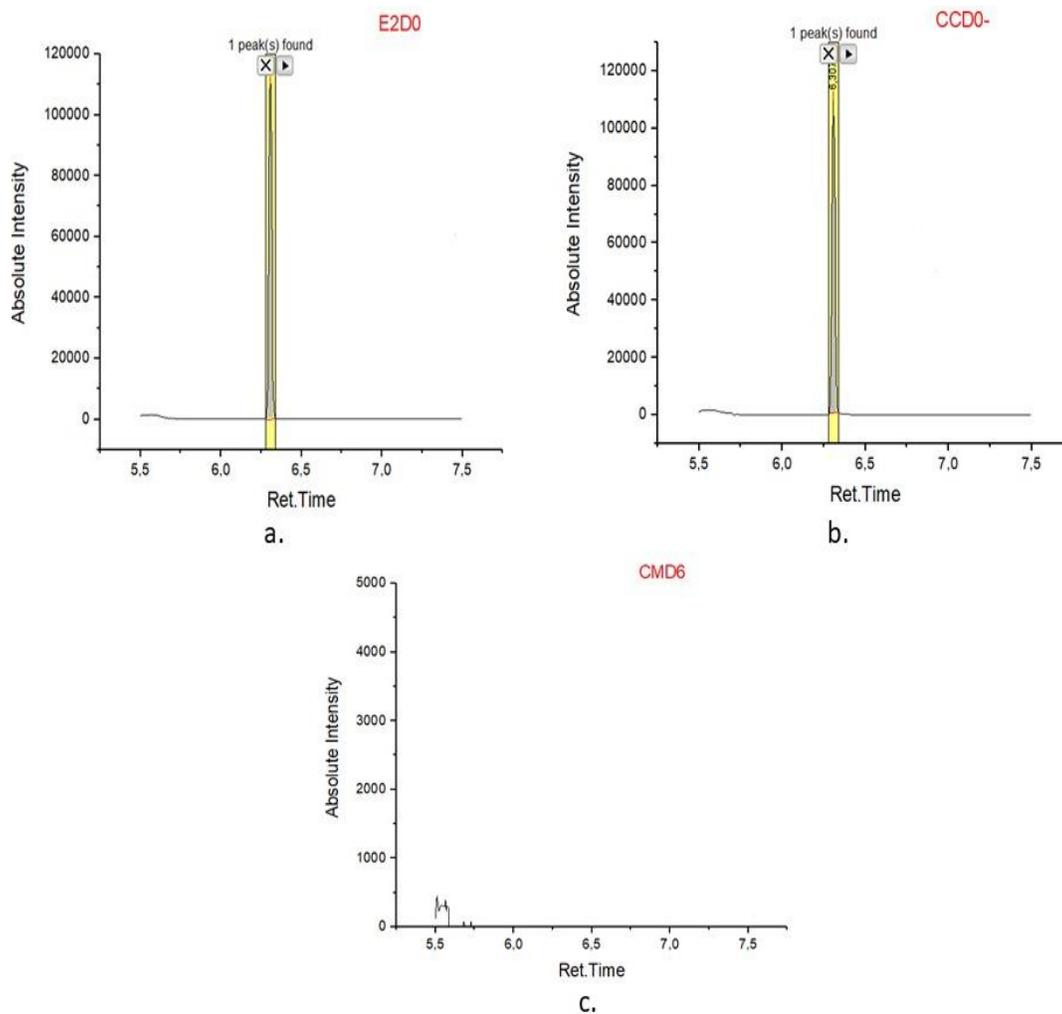


Figura 23. Cromatogramas del análisis de muestras. a. Cromatograma de la muestra de degradación. b. Cromatograma del control de carbofurano. c. Cromatograma del control de microorganismos

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos, permitieron conocer la cinética de degradación del carbofurano por parte del consorcio microbiano (Figura 24).

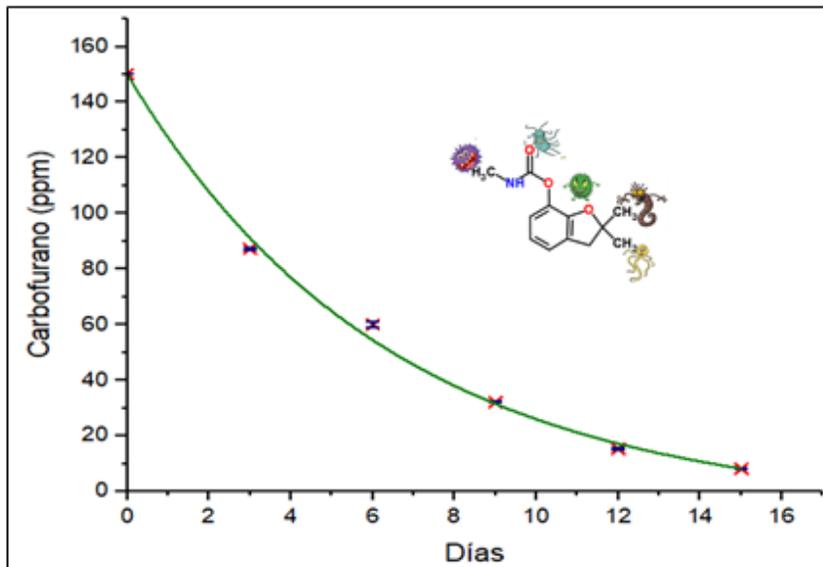


Figura 24. Cinética de degradación de carbofurano por parte del consorcio microbiano

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados evidencian que los microorganismos cuentan con la capacidad de degradar el compuesto de interés, mientras que en el suelo control que solo se tenía carbofurano, dicha concentración se mantuvo en los quince días sin presentar disminución alguna. Así mismo en las muestras utilizadas como control de microorganismos, se pudo apreciar que en ese tiempo en los hongos ni las bacterias produjeron algún tipo de compuesto que se evidenciara en las cromatografías (Figura 25).

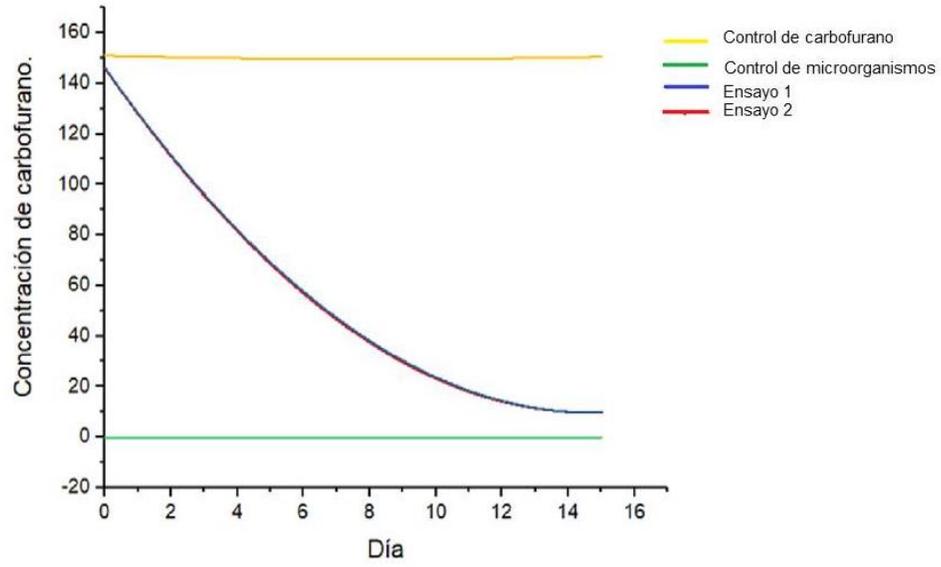


Figura 25. Resultados obtenidos por análisis cromatográfico de las muestras de suelo

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

Análisis fisicoquímico y ambiental.

Las actividades microbianas están relacionadas con las condiciones fisicoquímicas del medio en el cual se desarrollan. Se conoce que hongos y bacterias son gobernados por las leyes de la termodinámica (Desmond, 2014) pues la temperatura influye en la velocidad de procesos importantes como la respiración. En el presente trabajo, la temperatura de las parcelas registró valores bajos menores a 20 °C lo puede afectar algunos procesos como la capacidad de respiración, la descomposición de los residuos, el reciclado de nutrientes y la degradación de productos contaminantes como los pesticidas que llegan a los suelos tal como lo describen Brady & Weil (2016).

Otro parámetro importante en los procesos biológicos del suelo es la concentración de iones de hidrógeno o pH, el cual resultó ser moderadamente ácido en las parcelas experimentales. Esto puede deberse al laboreo de los suelos para la agricultura debido a que la adición de sustancias como abonos, fertilizantes o materia orgánica que son fuente de acidez para estos suelos y conducen a la pérdida de bases (Rui et al., 2017).

El pH bajo afecta la capacidad del suelo para mantener las diversas reacciones microbianas debido a que los suelos ácidos son pobres en elementos como calcio, magnesio, potasio y fósforo lo que reduce la actividad de los microorganismos (Fernández et al., 2006). Además, las enzimas presentes en el suelo encargadas de realizar procesos de biodegradación también son en su mayoría pH-dependientes (Kadri et al., 2017).

En el análisis de humedad se encontraron valores entre 30,67% y 37,33% y están dentro del rango óptimo requerido para cultivos de papa criolla según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). El contenido de agua en el suelo es importante, pues permite que ocurran reacciones metabólicas celulares importantes en los procesos de biodegradación, pero en algunos casos resulta perjudicial pues su exceso favorece lixiviación de sales y otros nutrientes, por lo que el agua regula todas las actividades biológicas del suelo (Qi et al., 2018).

En cuanto a los contenidos de fósforo se identificaron valores altos según los criterios de la calidad del suelo establecidos por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia (Miniambiente, 2016), en ello influyen los microorganismos, pues estos juegan un importante papel en procesos que afectan la transformación del fósforo en el suelo y su disponibilidad para las plantas. Los altos contenidos de fósforo benefician el crecimiento y nutrición de las plantas y da indicio de la diversidad microbiana presente en dichos suelos, además es importante para que los microorganismos realicen procesos de captación de gran cantidad de energía por medio de la intemperización de los minerales (Paul, 2014).

Con relación a la materia orgánica, todos los valores se encontraron por encima de diez por ciento, lo que favorece la retención de humedad para los cultivos y la formación de nitrógeno, también se facilitan los procesos de mineralización y el aumento de la cobertura vegetal que se convierte en el alimento de un gran número de microorganismos y beneficia el desarrollo de la planta en un sistema ecológico armónico (Julca, Meneses, Blas & Bello, 2006).

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) en la parcela control fue de 2,53 meq/100 g, según la tabla de referencia para este parámetro corresponde a una CIC muy baja, mientras que en las parcelas experimentales se registraron valores de 14,46; 12,14; y 13,16 meq/100 g, los cuales reflejan una CIC de nivel medio (Shiri et al., 2017).

El proceso de degradación microbiana de carbamatos en el suelo está altamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas, en especial con factores como la humedad, contenido de materia orgánica y pH (Aparicio et al., 2015). Las bacterias han sido empleadas en diversos procedimientos encaminados a la recuperación de los suelos, puesto que estas se cultivan con facilidad, crecen a altas velocidades y tienen la capacidad de emplear los contaminantes orgánicos para la generación de carbono y energía.

Identificación de los aislamientos y su tolerancia al carbofurano.

En el presente trabajo se obtuvo una diversidad de microorganismos nativos del suelo, capaces de crecer en presencia del xenobiótico carbofurano. En total fueron siete cepas bacterianas entre las que se identificó *Bacillus mycoide* cuyo hábitat común es el suelo, y se aísla

con frecuencia en ambientes con presencia de pesticidas y se ha descrito que actúa como biocontrolador de bacterias y hongos patógenos en plantas, por ello su importancia en la parte agrícola (Stratford, Woodley & Park, 2013). Aún no se han reportado investigaciones que mencionen la capacidad de esta bacteria para biodegradar pesticidas, pero sí sobre las posibles vías de degradación de *Bacillus mycoide* ante otros xenobióticos como el trinitrotolueno (Hong, Chang & Zu, 2013).

Las otras seis cepas de bacterias aisladas durante esta investigación corresponden a bacilos Gram negativos de diferentes géneros, los cuales se han identificado en diferentes suelos agrícolas con historia de aplicación de carbofurano (Castellanos & Rache, 2013). Dicha presencia se debe a que los microorganismos adaptan sus mecanismos genéticos a procesos metabólicos enzimáticos que por síntesis oxidan, hidrolizan e hidroxilan los pesticidas, aprovechando el pesticida como un importante generador de carbono, nitrógeno, azufre o fósforo, y ayudando a reducir de este modo la toxicidad del compuesto mediante actividad cometabólica o por mineralización completa (Fang et al., 2018).

Se ha descrito que determinadas bacterias como *Novosphingobium* sp. *Sphingomonas* sp. y *Pseudomonas* sp., descomponen el carbofurano en 3-hidroxicarbofurano (Figura 26a), 3-cetocarbofurano (Figura 26b), y tres metabolitos fenólicos: 7-fenol [2,3- dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol] (Figura 26c), 3,7-diol [2,3 dihidro-2,2-dimetil-3,7-benzofurandiol] y 3-ceto-7-fenol [2,3-dihidro-2,2-dimetil-3oxo-7-benzofuranol] (Castellanos, Galvis & Carreño, 2016)

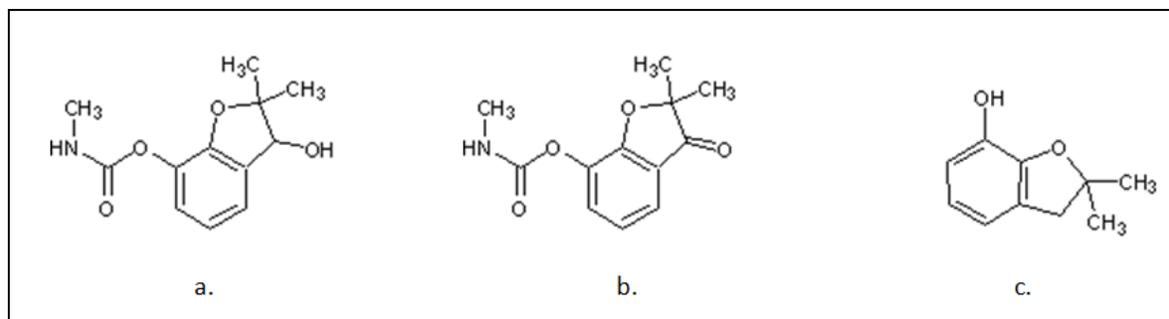


Figura 26. Productos de degradación del carbofurano.

Base de datos de Biocatálisis y Biodegradación de la Universidad de Minnesota

El 7-fenol (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol), parece ser el metabolito menos perjudicial y trabaja como generador de carbono y/o de nitrógeno para una diversidad de bacterias que hidrolizan carbofurano en suelos tratados con anticipación (Shin, Kim, Seong, Song & Ka, 2012). Posiblemente las bacterias encontradas en este estudio utilicen dichas rutas de degradación que les permite emplear el compuesto como su fuente de energía.

Según Das, Chakravarty, Sukul y Mukherje (1995) el carbofurano estimula el crecimiento de algunas especies bacterianas que también fueron encontradas en los aislamientos, como es el caso de *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp. y *Serratia* sp. Por su parte, *Pseudomonas* sp. ha sido reportada en diversos estudios que destacan su eficiente biodegradación de compuestos tóxicos como el carbamato (Castro et al., 2016).

El potencial de biodegradación de las bacterias ha sido estudiado en suelos contaminados con otros grupos de pesticidas como los organofosforados, se ha descrito la capacidad del género *Serratia* de biodegradar el pesticida en tan solo 18 horas (Glick et al., 2018). *Klebsiella* sp. también ha sido reportada por su capacidad de degradar este contaminante (Jaramillo, Bermúdez & Tirado, 2016).

Otra bacteria identificada fue *Stenotrophomonas maltophilia*, la cual se ha descrito en suelos contaminados con la herbicida atrazina y ha resultado eficaz en la biodegradación de un 98% de dicho compuesto (Rousseaux, Hartmann & Soulas, 2001). Sin embargo, no se encontró en la literatura ningún reporte referente a la biodegradación de carbofurano por esta cepa bacteriana

que resultó ser tolerante ante el compuesto evaluado durante este trabajo, y se convierte en un potencial microorganismo útil en la atenuación del plaguicida.

En cuanto al género *Salmonella*, también aislado e identificado, los resultados obtenidos muestran su capacidad de crecer en presencia de pesticidas, sin embargo, dicho microorganismo no es nativo del suelo, su hábitat es el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Su presencia en cultivos de papa criolla y demás suelos agrícolas se relaciona con las características fisicoquímicas y nutricionales del suelo que favorecen su crecimiento (Palacios et al., 1999). Dicho microorganismo no ha resultado interesante para ser empleado en la recuperación de ambientes contaminados, lo cual se puede deber a sus características patógenas.

En el caso de los hongos, en los últimos años se ha estudiado el potencial enzimático que poseen para biodegradar una amplia gama de xenobióticos como el carbofurano, del cual se conoce que es transformado a 3-hidroxicarbofuran por la enzima carbofuran 3-hidroxiylasa y posteriormente es a 3-ketocarbofuran por la enzima 3-hidroxicarbofuran deshidrogenasa (Ortiz, Sánchez, Dantán & Castrejón, 2013).

Los géneros fúngicos identificados en nuestro trabajo como *Fusarium*, *Mucor* y *Trichoderma*, son reconocidos por su capacidad de biodegradar compuestos recalcitrantes (Pernía, Demey, Inojosa & Naranjo, 2012). En el caso de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, estudios de peso seco evidencian el aumento de micelio cuando se incrementan las concentraciones de carbofurano, lo que indica que dicho compuesto es utilizado y asimilado como fuente de nutrientes (Afify et al., 2012).

Aspergillus niger se ha reportado por su capacidad para biodegradar contaminantes del suelo, y específicamente en suelos contaminados con carbofurano (Guiraud, Villemain, Kadri, Bordjiba & Steiman, 2003). Mientras que Das, et al., (2003) resaltan la importancia de *Fusarium* sp. en la degradación de dicho insecticida aplicado en plantaciones de arroz. La tolerancia a pesticidas por el hongo ambiental *Cunnigammella* sp. ha sido comprobada en compuestos como el pentaclorofenol (Sing, Zulkharnain, Roslan, Assim & Husaini, 2014), además cuenta con reconocimiento por su capacidad de metabolizar xenobióticos (Wackett & Gibson, 1982). Por su

parte, el hongo *Cladosporim* sp., ha mostrado la capacidad de crecer en presencia de plaguicidas como los piretroides y 3-fenoxibenzaldehído (Chen et al., 2011).

Alternaria sp. ha sido evaluado en otras investigaciones en las que se evidencia su capacidad de crecer a altas concentraciones de plaguicidas como endosulfán, clorpirifós y clorotalonil (Stamatiu et al., 2015); sin embargo, al realizar las pruebas de tolerancia al carbofurano, se observó que este no logro crecer, por lo que sería interesante conocer más acerca del metabolismo del hongo ante el pesticida y las razones que impiden su crecimiento a altas concentraciones del compuesto. Otro hongo que durante las pruebas de tolerancia no logro crecer a altas concentraciones de carbofurano fue *Emericella* sp. este es un microorganismo del suelo relacionado con *Aspergillus*, del cual no se conocen investigaciones relacionadas con su capacidad para degradar xenobióticos.

Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier FT-IR

Está técnica permitió caracterizar a seis microorganismos tolerantes al pesticida carbofurano. El análisis de los grupos funcionales en las regiones espectrales, mostró que la metodología empleada para la preparación de los microorganismos y obtención de espectros fue acertada pues se logró la repetitividad de los resultados.

Al superponer los espectros de las bacterias *Bacillus mycoide*, *Pseudomonas* sp y *Serratia marcescens*, se identificaron algunas similitudes en la mayoría de las regiones espectrales, sin embargo, se encontraron diferencias en la forma de las bandas asociadas a lípidos, proteínas y carbohidratos. En la primera ventana espectral, las tres bacterias mostraron una banda muy ancha debida al grupo O-H y a la absorción de dos modos vibracionales del estiramiento de N-H. En la segunda ventana, la región atribuida a la absorción de las cadenas de ácidos grasos de membranas, fosfolípidos y también a cadenas laterales de algunos aminoácidos y carbohidratos, se encontró solo un pico para *Bacillus mycoide*, mientras que en esta misma región *Pseudomonas* sp., presentó cuatro picos con diferentes intensidades al igual la bacteria *Serratia marcescens* (Zdenek & Susanne, 2001).

En la tercera región denominada Amida I II y proteínas, se pudo distinguir la banda de amidas I en las tres bacterias, notándose una mayor intensidad en *Pseudomonas* sp. La aparición de esta banda indica que los microorganismos analizados presentan un importante componente de biomasa celular, la forma de la banda es un indicativo de la composición porcentual de proteínas en estructura alfa hélice o beta. Las amidas II también se pudieron evidenciar con mayor intensidad en *Pseudomonas* sp, mientras que la banda de *Bacillus mycoide* y *Serratia marcescens* para este grupo fue similar.

En *Serratia marcescens* se encontró un mayor número de bandas que en las otras bacterias. En la cuarta región también llamada mixta, se pudieron notar las bandas cercanas a la región $1450\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ lo que indica la alta energía de las bacterias analizadas pues esta zona involucra grupos funcionales presentes en lípidos, proteínas carbohidratos y ácidos nucleicos. Los espectros de *Bacillus mycoide* y *Serratia marcescens* mostraron una banda en 1400 cm^{-1} , lo que indica que el grupo funcional -COO- confiere a estos microorganismos carbohidratos ácidos, ácidos grasos libres, o cadenas laterales de aminoácidos. Alrededor de los 1400 cm^{-1} también se evidencio una banda ancha pero no tan intensa, lo que indica el estiramiento asimétrico del enlace >P=O , constituyendo una superposición de bandas típicas que podrían provenir de fosfodiésteres, monoésteres, y fosfatos libres.

En la quinta región espectral se notó que las tres bacterias presentaron un pico ancho, con mayor intensidad en *Bacillus mycoide* y *Serratia marcescens*, esto ocurre por la unión de diversos oligos y polisacáridos que contienen los microorganismos. Por último, en la región de *fingerprint*, se encontraron tres picos para *Bacillus mycoide* y en las otras bacterias de a dos picos, siendo similar por su forma el correspondiente a 720 cm^{-1} que se trata de una frecuencia de vibración característica de los modos vibracionales de torsión del >CH_2 de ácidos grasos, en esta zona *Serratia marcescens* alcanzó una mayor absorbancia y *Pseudomonas* sp., resultó ser menos intensa (Beekes, Lasch & Naumann, 2007) (Jyoti et al., 2013).

Por parte de los hongos se realizó el análisis espectral (FT-IR) de *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp., en ellos se identificaron las ventanas espectrales, encontrándose a los 3400 cm^{-1} una banda ancha en los tres hongos, con mayor intensidad en *Mucor* sp. y menor en

Trichoderma sp. lo que indica la presencia del grupo OH en los tres hongos. En cuanto al contenido de lípidos, fosfolípidos y carbohidratos, también se evidenciaron las respectivas bandas con mayor intensidad para *Mucor* sp. En el análisis de amidas y proteínas *Aspergillus niger* presentó bandas más anchas e intensas con una notoria diferencia frente a *Trichoderma* sp.

En esta región el tamaño e intensidad de las bandas presentó variabilidad, y esto está relacionado con la biomasa celular y contenido proteico entre los tres hongos. Lo mismo se evidenció en la región mixta, indicando un alto contenido de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos para *Aspergillus niger*, los otros dos hongos también cuentan con estos componentes, pero en menor intensidad. La región espectral entre 1200 y 900 cm^{-1} correspondiente a ácidos nucleicos y fosfolípidos, se encontró una alta intensidad debida a la composición macromolecular de los hongos.

Finalmente, en la región del *fingerprint* los hongos mostraron aproximadamente dos a tres bandas de mediana intensidad. Los espectros de *Aspergillus niger* y *Mucor* sp. fueron comparados con los resultados obtenidos por Rajeev (2013) encontrándose similitudes lo que permite confirmar que se trata de dichos géneros fúngicos.

Ensayos de degradación individual.

Los seis microorganismos nativos previamente identificados y caracterizados al ser sometidos a ensayos individuales de degradación, mostraron tener buena capacidad para disminuir o transformar este compuesto, ya que en un periodo de quince días la bacteria *Pseudomonas* sp. logró degradar el 70,37 % del carbofurano, *Serratia marcescens* el 56 % y el *Bacillus mycoide* un 53,86% del pesticida; mientras que en los ensayos con hongos a los quince días *Trichoderma* sp degradó el 81,5 % *Mucor* sp el 73 % del plaguicida. *Aspergillus niger* degradó el 54,76 % en los primeros seis días del ensayo, pero en los días siguientes se presentó una alteración en los resultados de degradación de éste hongo, lo posiblemente que posiblemente se debe a la alta cantidad de metabolitos generados.

Diversas investigaciones se han enfocado en estudiar la capacidad los microorganismos del suelo para biotransformar o degradar compuestos altamente tóxicos como los pesticidas,

encontrándose que dicho proceso es posible gracias al metabolismo microbiano. En cuanto a las bacterias empleadas en este trabajo, se ha reportado que *Pseudomonas* sp. la bacteria que en este caso logró degradar mayor porcentaje de carbofurano, es capaz de hidroxilar carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato) en la posición 4 a 7-fenol (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-hidroxi benzofurano) y varios metabolitos desconocidos como el 4-hidroxicarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-4-hidroxi benzofuran-7-il metilcarbamato), con una masa (237) similar a 3-hidroxicarbofurano y 5-hidroxicarbofurano, pero con diferentes patrones de fragmentación. La transformación de este compuesto se da por una enzima oxidativa inducible, hidroxilasa, mediada por la conversión de carbofurano en 4-hidroxicarbofurano, y una segunda enzima hidrolasa sintetizada que transforma el carbofurano en 7-fenol (Gianfreda et al., 2016).

La hidrólisis de carbofurano por las hidrolasas reduce su toxicidad en gran magnitud (Hernández et al., 2013) siendo un método útil de desintoxicación enzimática, pues estas enzimas son potencialmente útiles en la descontaminación de compuestos peligrosos. Se ha reportado que la enzima carbofuran hidrolasa es codificada por el gen *mcd* el cual ha sido encontrado en bacterias capaces de adaptarse a los suelos tratados con carbofurano. Esta enzima ha sido purificada y biocaracterizada a partir de aislamientos de *Pseudomonas* sp., con pesos moleculares entre 72-77 kDa (Gong et al., 2016). La eficiencia de biodegradación de *Pseudomonas* sp., también ha sido comprobada para otros plaguicidas como permetrina y cipermetrina con eficiencia del 65% a 5 días de su aplicación en los suelos de los agroecosistemas afectados. Lo que indica que es una bacteria con alto potencial para procesos de recuperación de suelos (Muhammad et al., 2016).

Los ensayos de degradación del carbofurano por parte del *Bacillus mycoide*, permitieron establecer que dicha bacteria cuenta con potencial para poder eliminar o transformar este contaminante. Esto coincide con los resultados obtenidos por (Onunga et al., 2015), en los que se logró aislar e identificar a partir del suelo, una bacteria de morfología bacilo Gram positivo capaz de degradar en cultivos líquidos el carbofurano, utilizándolo como la única fuente de carbono y nitrógeno y removiendo el 98% del compuesto en 10 días. De dicha degradación resultaba como producto la formación de carbofuran fenol como el único metabolito detectable. Esta bacteria resultó ser un miembro de la especie *Bacillus* cuya capacidad de biodegradación indica que

tienen un gran potencial para la aplicación en la biorremediación de sitios de suelos contaminados con carbofurano (Onunga et al., 2015).

En cuanto a la bacteria *Serratia marcescens*, capaz de degradar el 56 % de carbofurano en el medio líquido, hasta el momento no se han reportado publicaciones que soporten la capacidad de esta bacteria en emplear este pesticida como fuente alimenticia, sin embargo ha sido reportada por su potencial para remover pesticidas presentes en el suelo como los organofosforados (Cycoñ et al., 2013) y otros altamente tóxicos como el DDT, del cual la bacteria pudo degradar hasta el 42% de los 50 mg/l iniciales de DDT en 10 días. De esta degradación resultaron cuatro metabolitos intermedios que al parecer no son tóxicos para la cepa ni el medio ambiente, lo que evidencia que es una bacteria de interés en procesos de recuperación de ambientes contaminados (Neerja et al., 2016).

Con relación al crecimiento, Se encontró que *Bacillus mycoide* fue la que alcanzó mayor crecimiento con $1,45 \times 10^7$ UFC/ml en los primeros siete días, lo que indica que desde el primer día fue capaz de adaptarse al carbofurano, logrando un crecimiento exponencial. El conteo de UFC/ ml revela el aumento en la biomasa de esta bacteria durante los primeros siete días, después se presentó un descenso continuo, lo que puede deberse al agotamiento de la fuente de carbono y/o nitrógeno, o que en el proceso de biotransformación se generó algún metabolito perjudicial para la bacteria (Chaudhry & Ali, 1998).

Pseudomonas sp., fue adaptándose lentamente al compuesto, alcanzando su máximo crecimiento a los 10 días del cultivo indicando la tolerabilidad y metabolización del carbofurano. Esta buena adaptación posiblemente ocurrió porque se dieron las condiciones óptimas para el crecimiento como fueron el pH y la temperatura (Qui et al., 2007). En los días siguientes se disminuyó mínimamente el número de colonias lo que corrobora la alta capacidad de esta bacteria para degradar compuestos utilizándolos para su metabolismo, así como lo evidencian sus rutas de degradación (Castellanos & Rache, 2013).

Por su parte *Serratia marcescens* fue la bacteria que menos creció, aunque en los primeros cinco días al parecer se adaptó al compuesto y lo empleo como fuente nutritiva, presento notoria

disminución de colonias y por ello también su menor capacidad de degradación respecto a las otras dos bacterias, seguramente esto se debe a algún metabolito que se generó los primeros días y resulto dañino para la bacteria.

Los ensayos de degradación fúngica revelaron que los tres hongos usados podían realizar la degradación del carbofurano, lo que puede ocurrir a través de la hidroxilación en la posición tres y la oxidación a 3-cetocarbofurano, según se ha podido establecer para las rutas de degradación de este xenobiotico (Gouma et al., 2014).

En los ensayos con *Aspergillus niger* los análisis por espectrofotometría UV/VIS permitieron establecer que, durante los primeros seis días del cultivo, el hongo presentó buena adaptación al carbofurano, lo anterior teniendo en cuenta que hubo disminución en la concentración del pesticida; pero curiosamente después de dicho tiempo el compuesto comenzó a incrementarse en el medio. Según investigaciones del metabolismo del carbofurano en medios líquidos por parte de *A. niger*, este resultado puede deberse a que los metabolitos que se generan en el medio tales como -hidroxicarbofurano, 3-cetocarbofurano y 3-cetocarbofurano fenol, se absorben a la misma longitud de onda que el carbofurano y eran estos los que aparecían al realizar el análisis, pues a mayor tiempo de cultivo mayor cantidad de metabolitos (Gouma et al., 2014). De esta manera la técnica de análisis por espectrofotometría no resulto muy efectiva para el análisis de la degradación por este hongo.

En cuanto al análisis del crecimiento del hongo, se identificó que el peso de la biomasa se incrementó durante los primeros días, pero al parecer el alto contenido de metabolitos en el medio líquido afecto el crecimiento del hongo por lo que se disminuyó su biomasa, pues se ha reportado que en algunos casos los metabolitos que produce el carbofurano pueden ser tóxicos (Ruiz et al., 2016).

Los experimentos con el hongo *Trichoderma* sp. mostraron una alta efectividad del microorganismo para biodegradar el carbofurano pues redujo el 81.5 % del compuesto en quince días. Otros estudios acerca de la capacidad de *Trichoderma harzianum* para degradar carbofurano han mostrado que este microorganismo logra biotransformar el compuesto a través

de un sistema oxidativo en el que el hongo usa el pesticida como fuente de carbono y nitrógeno, gracias a que sus enzimas actúan sobre el enlace de amida y éster en carbofurano (Afify, 2012).

En la presente investigación se pudo evidenciar que los pesos secos para *Trichoderma* sp aumentaban a medida que tomaba el carbofurano, dicho aumento en la biomasa puede deberse a este compuesto constituye un carbono adicional y una contribución de nitrógeno que permiten al hongo la síntesis de nuevos metabolitos secundarios favoreciendo la producción de biomasa microbiana y, en consecuencia, uso más rápido de carbofurano lo que concuerda con lo encontrado por (Afify, 2012) en sus estudios de biodegradación con *T. harzianum* y *T. viride*.

Respecto al hongo *Mucor* sp., también se evidencio su potencial para degradar el carbofurano pues removió el 73 % del compuesto en los quince días, además su crecimiento en el medio indica que el hongo se adaptó al compuesto y a medida que utilizaba el carbofurano como fuente nutritiva, se incrementaba la biomasa. Para este género fúngico, se han realizado estudios de biodegradación de carbofurano empleando *Mucor ramannianus*, en los que se determinó que al biodegradarse el compuesto se generan los metabolitos 2-hidoxi-3-(3-metilpropan-2-ol) fenol, 3-hidroxicarbofurano-7-fenol y 7a- (hidroximetil) -2,2-dimetilhexahidro-6H-furopiran. Lo cual sugiere que la degradación ocurre por hidrólisis en el anillo de furanilo (Seo et al., 2007).

Los microorganismos empleados en el presente estudio cuentan con el potencial para degradar el carbofurano, y como resultado de ello posiblemente se generan los metabolitos que previamente han sido identificados mediante el establecimiento de las rutas metabólicas, tales como: carbofurano fenol, 3-hidroxicarbofurano, 3-cetocarbofurano, 3-hidroxicarbofurano-fenol y 3-cetocarbofurano-fenol. Actualmente, se ha reportado que el carbofurano se degrada a 4-hidroxicarbofurano. Sin embargo, son escasos los estudios para identificar metabolitos microbianos de carbofurano resultantes de la escisión de anillos aromáticos o furanilo, y se sospecha que puede ocurrir por un posible intermediario metabólico de 2-hidroxil-3-(3-metilpropan-2-ol) fenol o 7a- (hidroximetil) -2,2-dimetilhexahidro-6H-furo [2,3 -b] piran-6-ona, resultante de la degradación fúngica del carbofurano-fenol como primer producto de degradación (Seo et al., 2007).

Ensayos de degradación por parte del consorcio de microorganismos.

Un resultado importante para destacar se presentó en los ensayos en suelo utilizando un consorcio microbiano pues éste fue potencialmente útil para degradar el carbofurano, logrando remover el 91.7 % del compuesto en tan solo quince días, lo que indica que las poblaciones celulares cooperaron, logrando que todas sus enzimas actuaran en el proceso metabólico para degradar el carbofurano (Robert et al., 2013).

La determinación de la disminución en las concentraciones del pesticida fue posible gracias a la efectividad del método de extracción por (MSPD), el cual es una excelente alternativa pues requiere pequeñas cantidades de muestra, es ambientalmente amigable y permite realizar varias extracciones en simultánea (Chaparro et al., 2017). El método aplicado para análisis por CG/MS permitió identificar satisfactoriamente el analito y así conocer el potencial del consorcio para la degradación del mismo, teniendo en cuenta que en los controles del experimento se pudo evidenciar que cuando no se adicionaron microorganismos a los ensayos, la concentración del carbofurano se mantuvo, y en aquellas muestras que solo contenían suelo y microorganismos no apareció ningún pico durante los análisis por CG/MS.

Por lo tanto, se puede decir que los métodos empleados para extracción y análisis proporcionan buena reproducibilidad, sensibilidad, curvas de calibración lineal y precisión, siendo adecuados y aplicables para determinar el pesticida carbofurano en los suelos de la papa criolla.

Conclusiones

El suelo de los cultivos de papa criolla utilizado en el presente estudio cuenta con condiciones fisicoquímicas que le permiten albergar una diversidad de bacterias y hongos con capacidad de tolerar pesticidas como el carbofurano.

Los microorganismos empleados en los ensayos de degradación se han adaptado a las condiciones del carbofurano, logrando emplearlo como fuente de nitrógeno o carbono, y así realizar su transformación tanto de manera individual como en consorcios.

La espectroscopia FTIR permitió establecer diferencias entre los hongos y bacterias según su variabilidad espectral y huellas digitales que indicaron los grupos funcionales presentes en estos microorganismos, requiriéndose para ello corto tiempo y bajos costos en comparación con otros métodos.

Pseudomonas sp. fue la bacteria que mejor degradó el carbofurano, removiendo un 70,4 % del compuesto en 15 días, mientras que en el caso de los hongos *Trichoderma* sp. logró la mejor degradación individual con un total de 81,5 % de disminución del pesticida.

Durante la degradación en medio líquido, se generan metabolitos que al llegar a altas concentraciones se absorben a una longitud de onda similar a la del carbofurano como sucedió con el hongo *A. niger*, por lo que la espectrofotometría UV/VIS presenta desventajas para el análisis de degradación.

El consorcio microbiano logró degradar el 91,7 % de carbofurano en el suelo, siendo mucho más efectivo que la degradación individual, indicando que existe un sinergismo y ayuda en los procesos metabólicos, cuando se presentan agrupaciones microbianas frente a compuestos tóxicos.

Recomendaciones

Se recomienda que los resultados obtenidos en este trabajo sean el punto de partida para proyectos encaminados a la biorremediación in situ de suelos contaminados con el pesticida carbofurano, pues este es un compuesto de alto uso por parte de los agricultores de la provincia.

Se deben trabajar proyectos que permitan establecer las rutas metabólicas que utiliza cada uno de estos microorganismos, estudiando las enzimas y genes responsables del proceso de degradación de diferentes compuestos tóxicos en ambientes contaminados.

Se recomienda el análisis e identificación molecular de las cepas empleadas para los ensayos de biodegradación.

Bibliografía

- Acebo González. D, Hernández García. A.T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. Revista CENIC ciencias biológicas, versión electrónica. Volumen 44 (1).
- Abass. K, Turpeinen. M, Rautio. A, Hakkola. J, Pelkonen. O. (2012). Metabolism of pesticides by human cytochrome P450 enzymes in vitro – a survey F. Perveen (Ed.), Insecticides – Advances in Integrated Pest Managemen, InTech, Austria.
- Afify, A.E.M.R., Ibrahim, G.M., Abo El Seoud, M.A., Helal, I.M.M., & Kassem, B.W. (2012). Exposing of *Trichoderma* spp to gamma radiation for stimulating its pesticide biodegradation activity. Proceeding of The Third International on Radiation Sciences and Applications, (p. 920). Egypt.
- Alvarez, Ordoñez A, Prieto M. 2010. Changes in ultrastructure and fourier transform infrared spectrum of *Salmonella enterica* serovar typhimurium cells after exposure to stress conditions. Applied and Environmental Microbiology 76: 7598-7607.
- Alvarez. A, Mouwen. D.J, López. M, Prieto. M. (2011). Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods. 84, 369-378, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.009>.
- Bano, N. and J. Musarrat. (2004). Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. FEMS Microbiol. Lett. 231, 13-17.
- Bansal OP. (2012). Degradation of pesticides Editorial CRC Press.

- Barnett, H., and Hunter, B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Third edition. pp. v+241. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19721103191>
- Barratt, S., Ennos, A., Greenhalgh, M., Robson, G., & Handley, P. (2003). Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *Journal of Applied Microbiology*, 95(1), 78-85. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01961.x
- Beekes Michael, Lasch Peter, Naumann Dieter. (2007). Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Veterinary Microbiology*, Elsevier, 123 (4), pp.305.
- Beibei, W., Ying, T., Yongfeng, X., Wei, Ch., Wenjie, R., Yan, L., Peter, C., Yongming, L. (2018). Effect of mixed soil microbiomes on pyrene removal and the response of the soil microorganisms. *Science of The Total Environment 640–641*, 9-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.290>.
- Betancur, B. Peñuela, G. Cardona, S.A. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas caso:DDT. *Gestión y Ambiente*, 68, 119-135.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74, 63- 67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3).
- Brady, N., & Weil, R. (2016). *The Nature and Properties of Soils*. Columbus, USA: Pearson.
- Bustillo A. E. (2010). Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos. Reporte técnico. Universidad Nacional de Colombia - Palmira, Colombia. DOI: 10.13140/RG.2.1.3594.5128 Report number: 2, Affiliation: Universidad Nacional de Colombia - Palmira, Colombia.

- Camacho, A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf.
- Campillo, R., & Sadzawaka, R. (2006). La acidificación de los suelos, origen y mecanismos involucrados. Recuperado de <http://www.profertilnutrientes.com.ar/archivos/la-acidificacion-de-los-suelos-origen-y-mecanismos-involucrados>.
- Cantón, R., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., & García, J. (2000) Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recuperado de <http://www.seimc.org>.
- Capriotti A L, Cavaliere C, Giansanti P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*. 1217, 16 2521-2532, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.030>.
- Capriotti A L, Cavaliere C, Laganà A, Piovesana S, Samperi R. (2013). Recent trends in matrix solid-phase dispersion, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 43 53-66.
- Carrillo, L. (2003). Clave especies de mohos comunes en alimentos y forrajes. En: Carrillo L. *Los hongos de los alimentos y forrajes*, primera edición (pp. 44-69). Argentina: Universidad Nacional de Salta.
- Castellanos, Rozo, J., and L. Y. Rache Cardenal. (2013). Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas N-metilcarbamatos. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 29 (SPEC.ISSUE), 105-119.
- Castellanos, J., Galvis, J., Carreno, A. (2016). Biodegradación de carbofuran y carbaril por *Sphingomonas* sp., S8-M3-13. *Agronomía & Ambiente*. 36, 42-52.

- Castro, V., Masís, M., Caminal, G., Vicent, T., Carazo, E., Rojas, M., López, C., & Rodríguez, E. (2016). A microbial consortium from a biomixture swiftly degrades high concentrations of carbofuran in fluidized-bed reactors. *Process Biochemistry*, 51(10), 1585-1593. doi: 10.1016/j.procbio.2016.07.003.
- Chaparro, García AL, Rodriguez, Martinez R, Quijano-Parra A, Lizarazo-Gutierrez LF. (2017). Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para la determinación de carbofurano en suelos. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 18(1):89-102 Doi: http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:560.
- Chaudhry, G.R. and Ali, H.D. (1988) Bacterial metabolism of carbofuran. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1414-1419.
- Corporación Colombiana de investigación agraria [Corpoica]. (2013). Guía toma de muestras de suelos. Recuperado de https://asociados.porkcolombia.co/porcicultores/images/porcicultores/convenios/corpoica/VC_G_06_Guia_toma_muestras_de_suelo.pdf.
- Cycoń, M. Żmijowska, A. Wójcik, M. Piotrowska, Z. (2013). Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils, *Journal of Environmental Management*, 117; 7-16. doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.12.031.
- Das, A., Chakravarty, A., Sukul, P., & Mukherjee, D. (1995). Insecticides: their effect on microorganisms and persistence in rice soil. *Microbiological Research*, 150(2), 187-194. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80055-8](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80055-8).
- Del Puerto Rodríguez, Asela M, Suárez Tamayo, Susana, y Palacio Estrada, Daniel E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 52(3), 372-387. versión On-line ISSN 1561-3003.

- Desmond-Le Quémener, E., Bouchez, T. (2014). A thermodynamic theory of microbial growth. *The ISME journal International Society for Microbial Ecology*, 8(8), 1747-51. doi: [10.1038/ismej.2014.7].
- Dhouib, I.B. Annabi, A., Jallouli, M., Marzouki, S., Gharbi, N., Elfazaa, S., Lasram, M.M. (2016). Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A review. *Journal of Applied Biomedicine*.14 (2) 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2016.01.001>.
- Dong, J.F., Ping L., Jian S., Sai, Y. Z., Han, Z.X (2018). Mechanisms of synergistic neurotoxicity induced by two high risk pesticide residues – Chlorpyrifos and Carbofuran via oxidative stress. *Toxicology in Vitro*. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.10.016
- Drobnik, T., Greiner, L., Keller, A., Grêt R. A. (2018). Soil quality indicators From soil functions to ecosystem services. *Ecological Indicators*, 94, (1) 151-169. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.06.052>.
- EPA, E. P. (2007). Insecticidas Carbamatos de N-Metilo. Recuperado de <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spch5.pdf>.
- Evert, S. (2002). Environmental fate of carbofuran environmental monitoring branch. Department of pesticide regulation. Sacramento. Disponible en: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/carbofuran.pdf>.
- 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.
- Fang, H., Zhang, H., Han, L., Mei, J., Ge, Q., Long, Z., Yu, Y. (2018). Exploring bacterial communities and biodegradation genes in activated sludge from pesticide wastewater treatment plants via metagenomic analysis. *Environmental Pollution*. 243 (B), 1206-1216. DOI <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.080>.

Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, E., Zegarra, H., Uribe, R., ... Arce J. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. México: Instituto Mexicano del Petróleo.

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>

Fishel, F.M. (2017). Pesticide Characteristics. Gainesville: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. <http://edis.ifas.ufl.edu>.

Fondo para el financiamiento del sector agropecuario (Finagro). 2014. Perspectiva del sector agropecuario colombiano. Bogota, Colombia. Recuperado en https://www.finagro.com.co/sites/default/files/2014_09_09_perspectivas_agropecuarias.pdf

Food and Agriculture Organization (FAO). (2018). FAO soils portal. Recuperado de <http://www.fao.org/soils-portal>.

Flores Gallegos C; Contreras Esquivel JC; Reyes Valdes M; Rodriguez Herrera R. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. Volumen 4, No. 8.

Gandarilla, F. L., Galán, L. J., Arévalo, K., Elías, Myriam., & Quintero, I. (2013). Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia*, 47(3), 255-266. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140531952013000300005&lng=es&tlng=es.

- Gao J, Kane L and Turnbull M. (2008). Universidad de Minnesota, Base de datos de biocatalisis y Biodegradación. Recuperado de http://eawagbbd.ethz.ch/cbf/cbf_map.html.
- Garip. S, Cetin Gozen. A, Severcan. F. (2009). Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of Bacillus and Micrococcus isolates, Food Chemistry, Volume 113, Issue 4, 1301-1307, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.063>.
- Gbadegesin, M.A., Owumi, S.E., Akinseye, V., Odunola, O.A., (2014). Evaluation of hepatotoxicity and clastogenicity of carbofuran in male Wistar rats. Food Chem. Toxicol. 65, 115–119.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., Scelza, R., De La Luz Mora, M. (2016). Chapter 6 - Role of Enzymes in Environment Cleanup/Remediation. Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass, Volume undefined, Issue undefined, Academic Press, 133-155. DOI:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00006-X>.
- Glick, B.R. (2018). Soil Microbes and Sustainable Agriculture. *Pedosphere*, 28, (2),167-169. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60020-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60020-7).
- Gong T, Liu R, Che Y, Xu X, Zhao F, Yu H, Song C, Liu Y, Yang C. (2016). Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for simultaneous degradation of carbofuran and chlorpyrifos. Microbial biotechnology, 9(6):792-800. doi: 10.1111/1751-7915.12381.
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, AC, Magan, N. (2014). Book Chapter 13. Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. Editor: Surajit Das. Microbial Biodegradation and Bioremediation, Elsevier. 301-323. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00013-3>.
- Gray, John., Bewers, J.M., He, Xiaojia. (2018). Pollution: Approaches to Pollution Control, *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, Elsevier. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11286-2>.

- Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., Wu, L. (2011). Pesticides industry sales and usage: 2006 and 2007 market estimates. Biological and economic analysis division. Office of pesticide programs. Office of chemical safety and pollution prevention. U.S Environmental protection agency. Washington, DC 20460.
- Guiraud, P., Villemain, D., Kadri, M., Bordjiba, O., & Steiman, R. (2003). Biodegradation capability of *Absidia fusca* Linnemann towards environmental pollutants. *Chemosphere*, 52(4), 663-671. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00229-7.
- Hamaki T, Suzuki M, Fudou R, Jojima Y, Kajiura T, Tabuchi A, Sen K, Shibai H.(2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng*. 99(5):485-92. DOI: 10.1263/jbb.99.485.
- Hernandez, A.F., Parr onb, T., Tsatsakisd, A.M., Requenab, M., Alarconc, R., and Lopez-Guarnidoa, O. (2013) Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology* 307: 136–145.
- Hmimou, Abderrahim and Maslouhi, Abdellatif and Tamoh, Karim and Candela, Lucila. (2014). Experimental monitoring and numerical study of pesticide (carbofuran) transfer in an agricultural soil at a field site. *Comptes Rendus Geosciences* 346. 9-10. DOI: 10.1016/j.crte.2014.03.003.
- Hoff, RB, Pizzolato, TM. (2018). Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 109,83-96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.002>.

- Hong-yan, L., Chang-Ping, Y., & Zu-Liang, C. (2013). Aerobic and anaerobic biodegradation of TNT by newly isolated *Bacillus mycoides*. *Ecological engineering*, 52, 270-277. doi: 10.1016/j.ecoleng.2012.11.004.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2017. Químicos/registros-de-venta Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas>.
- Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales [IDEAM]. (2004). El medio ambiente en Colombia. 3a Edición. Bogotá Colombia.
- Jaramillo, B., Bermúdez, A., & Tirado, I. (2016). Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados presentes en suelos contaminados. *Ciencias Técnicas Agropecuaria*, 25(3), 13-22. Doi: 10.13140/RG.2.2.20023.73126.
- Jiménez, A. (2014). “Degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión por cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola”. (Tesis de posgrado). Universidad Veracruzana. Tuxpan.
- Julca-Otiniano, A., Meneses-Florián, L., Blas-Sevillano, R., & Bello-Amez, S. (2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia*, 24(1), 49-61. doi: 10.4067/S0718-34292006000100009.
- Jyoti Prakash Maity, Sandeep Kar, Chao-Ming Lin, Chen-Yen Chen, Young-Fo Chang, Jiin-Shuh Jean, Thomas R. Kulp. (2013). Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 116, 478-484. doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.062.
- Kadri, T., Rouissi, T., Kau- Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes. *Journal of Environmental Sciences*, 51, 52-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>.

Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W., Procop, G., & Woods, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Laboratories EAG. (2018). Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS). Recuperado de: <https://www.eag.com/techniques/mass-spec/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms/>.

Lara-Sandoval, A., Chaparro-Acuña, S. (2017). Cuantificación voltamétrica de carbofurano en papa *Solanum tuberosum* L., Solanaceae. Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18 (2), 275-284. DOI: http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:627

Leal, A., Álvarez, C., Cortes, J., & Ovalle, M. (2014). Boletín informativo Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá. Recuperado de http://www.grebo.org/documentos/Boletin_Grebo_2014.pdf.

Lecellier. A, Gaydou. V, Mounier. J, Hermet. A, Castrec. L, Barbier. G, Ablain. W, Manfait. M, Toubas. D, Sockalingum. G.D. (2015). Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiology*. Volume 45, Part A, 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.002>.

Liu. L, Xu. D, Hu. Y, Liu. S, Wei. H, Zheng. J, Wang. G, Hu. X, Wang. Ch. (2015). Construction of an impedimetric immunosensor for label-free detecting carbofuran residual in agricultural and environmental samples, *Food Control*, 53, 72-80, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.009>.

Lopez-Goñi. D.I. (2015). Los microbios que te rodean. Unidad IV; Microbios Biotecnología. Universidad de Navarra. Recuperado https://www.academia.edu/11067240/Los_microbios_que_te_rodean.

Mäntele, W., Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 965-968. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>.

- Mariño. D.J., (2015). Plaguicidas, letales para los humanos. Unimedios. Ciencia & Tecnología. Agencia de noticias Universidad Nacional de Colombia. N°269. Recuperado en <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/plaguicidas-letales-para-los-humanos.html>
- McFarland latex standards, The Hardy Diagnostics. (1996). Recuperado de https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/McFarlandStds.htm. Consultado febrero/2016.
- Mendoza J.C., Perea Y.S., Salvador J.A., Morales J.A y Pérez G. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. Avances en ciencias e ingeniería. 2(3), pp. 45-55.
- Menezes A, Neves F, Pereira P. (2010). Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples, *Microchemical Journal*, 96, 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.018>.
- Ministerio del Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales República de Colombia. (2010). Auto 0149. Recuperado de http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/Otros/Autos/2010/auto_0149_250110.pdf.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Grupo de Divulgación de Conocimiento y Cultura Ambiental – Centro de documentación. (2016). Política para la gestión sostenible del suelo. Bogotá, D.C.: Colombia. Recuperado de http://www.andi.com.co/Uploads/Pol%C3%ADtica_para_la_gesti%C3%B3n_sostenible_del_suelo_FINAL.pdf
- Muhammad Kashif Javaid, Mehrban Ashiq y Muhammad Tahir. (2016). Potential of Biological Agents in Decontamination of Agricultural Soil. *Scientifica (Cairo)*. 2016:1598325. doi: 10.1155/2016/1598325.

Neerja, Jasneet Grewal, Amrik Bhattacharya, Sumit Kumar, Dileep K. Singh & Sunil K. Khare (2016) Biodegradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by using *Serratia marcescens* NCIM 2919, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51:12, 809-816, DOI: 10.1080/03601234.2016.1208455.

NIST Mass Spectrometry Data Center Collection (C). (2014). copyright by the U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. All rights reserved. ACCUSTANDARD Chemicals / NIST MS Data Center Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1563662&Mask=200>.

Observatorio latinoamericano de conflictos ambientales. (2014). Lista provisoria de plaguicidas registrados en Chile que están prohibidos o severamente restringidos por gobiernos y sus efectos sanitarios y ambientales. Recuperado de: <http://www.olca.cl/oca/plaguicidas/plag03.htm>.

Onunga, D., Kowino, I., Ngigi, A.N., Osogo, A., Orata, F., Getenga, Z y Were, H. (2015) Biodegradation of carbofuran in soils within Nzoia River Basin, Kenya, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50:6, 387-397, DOI: 10.1080/03601234.2015.1011965.

OPS Diagnostics LLC. (2017). Bacteria Freeze Drying Protocol. Recuperado de: <https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpbacteriafdprotocol.htm>.

Ortiz, H., Sánchez, S. (2010). Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 26 (1). 27-38.

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.

- Palacios, M., Lupiola, P., Del Nero, E., Pardo, A., Rodríguez, F., Pita, M. & Tejedor M. (1999). Primeros resultados del estudio de la persistencia de Salmonella en la zona no saturada del suelo agrícola. *Estudios de la zona no saturada del suelo*. (pp. 127-130). Recuperado de http://abe.ufl.edu/carpena/files/pdf/zona_no_saturada/estudios_de_la_zona_v4/iii-05.pdf.
- Pam. A.A. (2015). Degradation Kinetics Study of Monocrotophos Pesticide (MCP) In Unsterilized Soil in Nigeria. *Chemical & Environmental Sciences*. 8-13. <http://dx.doi.org/10.15242/IICBE.C0915019>.
- Patcharaporn Pimmata, Alissara Reungsang, Pensri Plangklang (2013). Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 85, 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.07.009>.
- Paul, E. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. San Diego: Academic press. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124159556>.
- Pernía, B., Demey, J., Inojosa, Y., & Naranjo, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados: un metaanálisis. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3(1), 1-40. Recuperado de <http://www.solabiaa.org/ojs3/index.php/RELBAA/issue/view/9>.
- Peter Kusch. (2017). Application of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS) in failure analysis in the automotive industry. *Engineering Failure Analysis*. 82, 726-732, <https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2017.06.033>.
- Pinilla, Monsalve GD, Manrique, Hernández EF, Caballero, Carvajal AJ, Gómez, Rodríguez E, Marín, Hernández LR, Portilla, Portilla A, Sierra, Avendaño JA, Prieto, Serrano HJ, Oviedo, Pastrana DF, Gamboa, Toloza N. (2014). Neurotoxicología de Plaguicidas Prevalentes en la Región Andina Colombiana. *MÉD.UIS* ;27(3):57-67.

- Plan de Desarrollo (2012-2015) "Un Norte Pa'lante". Gobernación del Norte de Santander. Recuperado de: <http://www.nortedesantander.gov.co/Gobernaci%C3%B3n/Documentos-de-la-Entidad/Plan-Estrat%C3%A9gico-Sectorial>.
- Prashar, P., Shah, S. (2016). Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. *Sustainable Agriculture Reviews*. 19, 331–362. doi: 10.1007/978-3-319-26777-7_8
- Qi, J., Zhang, X., McCarty, GW, Sadeghi, AM, Cosh, MH, Zeng, X., Gao, F., Daughtry, CST, Huang, C., Lang, MW, Arnold, JG. (2018). Assessing the performance of a physically-based soil moisture module integrated within the Soil and Water Assessment Tool. *Environmental Modelling & Software*. 109, 329-341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2018.08.024>.
- Qui, Xiang, Y., Qing, H., Peng, H., Xiao, Jun, D., Yu, Jia, S., & Shun, Peng, L. (2007). Isolation and characterization of a carbofuran-degrading strain *Novosphingobium* sp.FND-3. *Federation of European Microbiological Societies*, Vol.5, 207–213.
- Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R. (2011). Mixtures of environmental pollutants: effects on microorganisms and their activities in soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 211: 63-120.
- Ramesh, M., Narmadha, S., Poopal, R.K. (2015) Toxicity of furadan (carbofuran 3% g) in *Cyprinus carpio*: Haematological, biochemical and enzymological alterations and recovery response. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, (4), 314-326. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.11.008>.
- Rui, Li., Rui, T., Ning, L., Guixin,Ch. (2017). Chemical, organic and bio-fertilizer management practices effect on soil physicochemical property and antagonistic bacteria abundance of a cotton field: Implications for soil biological quality. *Soil and Tillage Research*, 167, 30-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.11.001>.

- Riya P, Jagatpati T. (2012). Biodegradation and bioremediation of pesticides in Soil: Its Objectives, Classification of Pesticides, Factors and Recent Developments. *World Journal of Science and Technology*. 2(7): 36-41.
- Robert P. Smith, Yu Tanouchi, Lingchong You. (2013). Chapter 13 - Synthetic Microbial Synthetic Biology Academic Press. 243-258. Doi.org/10.1016/B978-0-12-394430-6.00013-3.
- Rodríguez Gómez, L. (2015). Informe: Así es el mundo de la papa colombiana. Diario: Contexto ganadero. Recuperado de <https://www.contextoganadero.com/>
- Rodríguez Pérez, S.; M.A. Crescencia Arone; J. Soria Calzadillo; I.A. Aguilera Rodríguez; M.J Serrat Díaz. (2017). "Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos." *Afinidad* [online], Vol. 74, Núm. 577. <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320783/411265> [Views: 15-05-18.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., & Soulas, G. (2001). Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS. Microbiology Ecology*, 36(2-3), 211-222. doi: 10.1016/S0168-6496(01)00135-0.
- Ruíz-Hidalgo, K., Masís-Mora M., Barbieri, E., Carazo-Rojas, C. Rodríguez-Rodríguez. E. (2016). Ecotoxicological analysis during the removal of carbofuran in fungal bioaugmented matrices. *Chemosphere* 144, 864-871. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.056>.
- Sarmah Ajit K, Müller Karin Ahmad Riaz (2004) Fate and behaviour of pesticides in the agroecosystem a review with a New Zealand perspective. *Soil Research* 42, 125-154. <https://doi.org/10.1071/SR03100>.
- Santucho, N. (2012). The carbofurane controversy. *Chemistry and Industry*. 76(2), 12-14.

- Satar, S., Seydaoglu, G., Alparslan, N. (2005). Frequency and mortality risk factors of acute adult poisoning in Adana, Turkey, 1997-2002. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 72, 393-401.
- Seminis. (2016). ¿Qué Es El Suelo? Recuperado de <http://www.seminis.mx/blog-que-es-el-suelo/>.
- Seo, Jiyoung and Jeon, Junho and Kim, Sang-Don and Kang, Suil and Han, Jaehong and Hur, Hor-Gil (2007). Fungal biodegradation of carbofuran and carbofuran phenol by the fungus *Mucor ramannianus*: identification of metabolites. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 55(1-2):163-7. Doi: 10.2166/wst.2007.051.
- Shin, D., Kim, D., Seong, C., Song, H., & Ka, J. (2012). Genetic and phenotypic diversity of carbofuran-degrading bacteria isolated from agricultural soils. *J Microbiology Biotechnology*, 22(4), 448-456. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1108.08087>.
- Shiri, J., Keshavarzi, A., Kisi, O., Iturraran-Viveros, U., Bagherzadeh, A., Mousavi, R., Karimi, S. (2017). Modeling soil cation exchange capacity using soil parameters: Assessing the heuristic models. *Computers and Electronics in Agriculture*, 135, 242-251. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.02.016>.
- Shen YJ, Lu P, Mei H, Yu HJ, Hong Q, Li SP. (2010). Isolation of a methyl-parathion degrading strain *Stenotrophomonas* sp. SMSP-1 and cloning of the *ophc2* gene. *Biodegradation*. 21: 785-792. Doi:10.1007/s10532-010-9343-2.
- Shi H, Pei L, Gu S, Zhu S, Wang Y, Zhang Y, Li B. (2012). Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics* 100(5): 327-335.

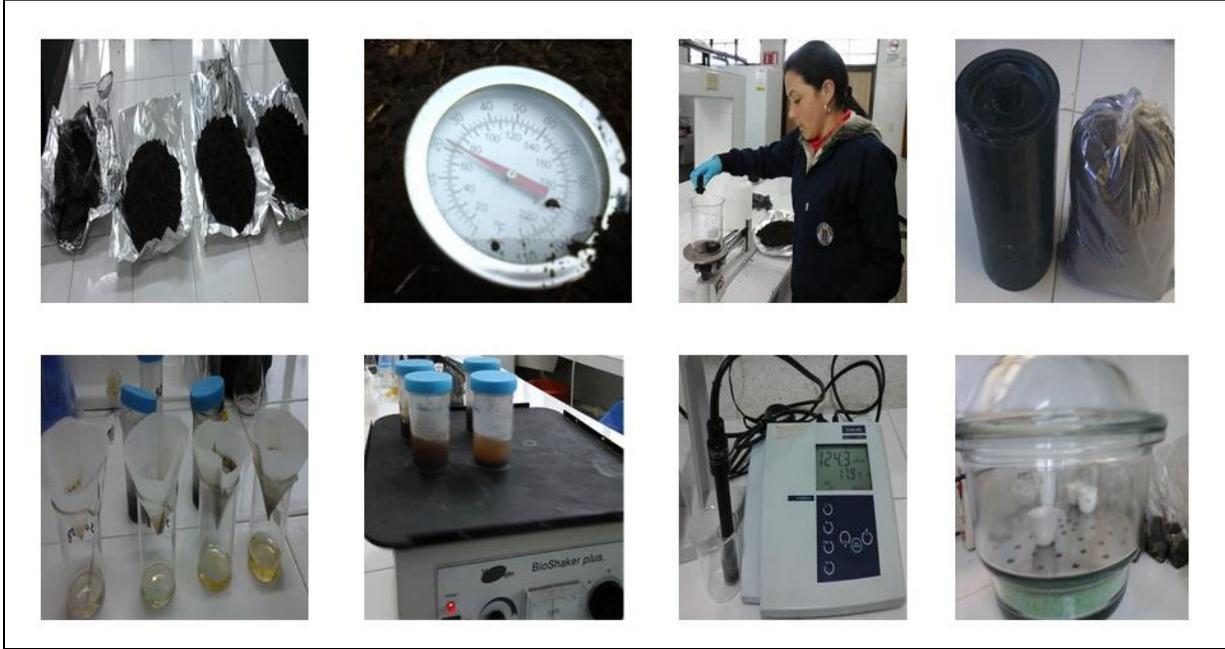
- Shukla KP, Singh NK and Sharma S. (2010). Biorremediation: Developments, current practices and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology journal* 3: 1-20.
- Sing, N., Zulkharnain, A., Roslan, H., Assim, Z., & Husaini, A. (2014). Bioremediation of PCP by *Trichoderma* and *Cunninghamella* Strains Isolated from Sawdust. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(6), 811-820. doi:10.1590/S1516-8913201402852.
- Sivagnanam Silambarasan, Jayanthi Abraham. (2013). Kinetic studies on enhancement of degradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP by a newly isolated *Alcaligenes* sp. JAS1, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Volume 44, Issue 3, Pages 438-445, doi.org/10.1016/j.jtice.2012.12.002.
- Song, X. (2014) Carbofuran, *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition). Editor(s): Philip Wexler. Academic Press, Pages 673-674. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00108-1>.
- Stamatiu, Sánchez, K., Alarcón, A., Ferrera, Cerrato, R., Nava, Díaz, C., Sánchez, Escudero, J., Cruz, Sánchez, J., & Castillo, M. (2015). Tolerancia de hongos filamentosos a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones in vitro. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 31(1), 23-37. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/370/37036860002.pdf>.
- Stratford, J., Woodley, M., & Park, S. (2013). Variation in the morphology of *Bacillus mycoides* due to applied force and substrate structure. *PLOS ONE*, 8(12), e81549. doi: 0.1371/journal.pone.0081549.
- Sun, X., Zhu, Y., & Wang, X. (2012). Amperometric immunosensor based on deposited gold nanocrystals/4, 4'-thiobisbenzenethiol for determination of carbofuran. *Food Control*, 28, 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.027>.

- Tamrakar, U. Pillai, A.K. Gupta, V. (2007). A simple colorimetric method for the determination of carbo-furan and its application in environmental and bio-logical samples. *J Braz Chem Soc*, 18(2), 337-341. doi: 10.1590/S0103-50532007000200014.
- Vanwallegem, T., Gómez, J.A., Infante, J. González, M., Vanderlinden, K., Guzmán, G., Laguna A., Giráldez, J.V. (2017) Impact of historical land use and soil management change on soil erosion and agricultural sustainability during the Anthropocene. *Anthropocene* 17, 13-29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ancene.2017.01.002>
- Venton, B.J. (2018). Fundamentos de la química analítica. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis). Recuperado de <https://www.jove.com/science-education/10204/espectroscopia-ultravioleta-visible-uv-vis>.
- Vischetti C, Casucci C, Perucci P. (2002). Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation. *Biology and Fertility of Soils* 35(1):13-17. DOI: 10.1007/s00374-001-0433-5.
- Wackett, L., & Gibson, D. (1982). Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus *Cunninghamella elegans*. *Biochemical Journal*, 205(1), 117-122. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../biochemj00372-0121.pdf>.
- Wenning, M., Scherer, S., (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97,7111-7120.
- Wenning, M., Breitenwieser, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U., Scherer, S. (2014). Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 103,44-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.011>.

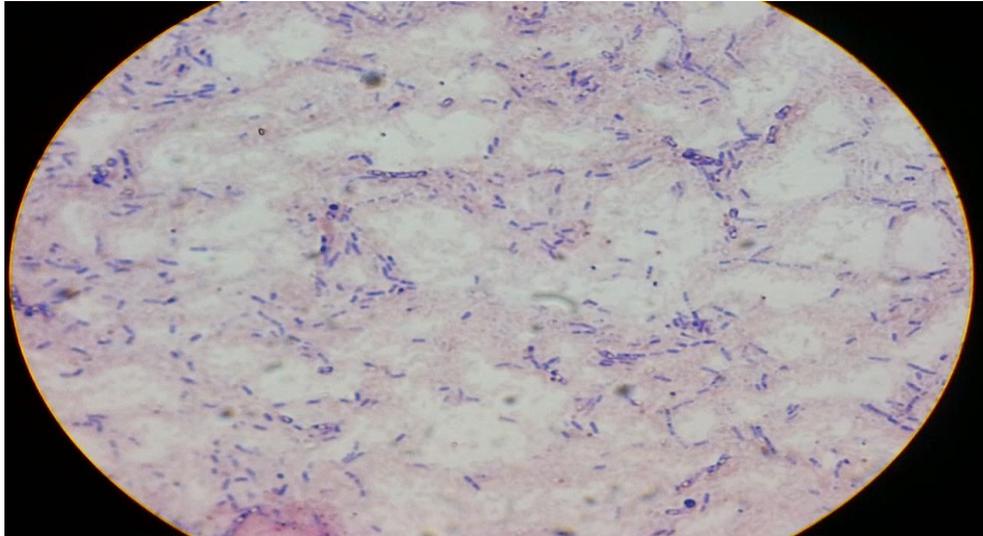
- Wessman, P., Håkansson, S., Leifer, K., & Rubino, S. (2013). Formulations for Freeze-drying of Bacteria and Their Influence on Cell Survival. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (78), 4058. Advance online publication. <http://doi.org/10.3791/4058>.
- Wolfaardt G.M., Korber D.R., Lawrence J.R. (2007). Cultivation of microbial consortia and communities, in: C.J. Hurst, R.L. Crawford, J.L. Garland, D.A. Lipson, A.L. Mills, L.D. Stetzenbach (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Washington DC, , pp. 101–111.
- Yan Q-X, Hong Q, Han P, Dong X-J, Shen YJ, Li SP. (2007). Isolation and characterization of a carbofuran degrading strain *Novosphingobium* sp. FND-3. *FEMS Microbiol Lett.* 271: 207-213.
- Zdenek Filip, Susanne Hermann. (2001). An attempt to differentiate *Pseudomonas* spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. *European Journal of Soil Biology*, 37 (3)137-143, [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01078-0](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01078-0).
- Zhai, Y., Li, K., Song, J., Shi, Y., Yan, Y., (2012). Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *ochrobactrum anthropi* YZ-1. *J. Hazard. Mater.* 221–222, 206–212.
- Zhang, H., Watts, S., Philix, M.C., Snyder, S.A., Ong, C.N. (2018). Occurrence and distribution of pesticides in precipitation as revealed by targeted screening through GC-MS/MS. *Chemosphere*, 211, 210-217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.151>.
- Zhu, Y., Cao, Y., Sun, X., & Wang, X. (2013). Amperometric immunosensor for carbofuran detection based on MWCNTs/GS-PEI-Au and AuNPs-antibody conjugate. *Sensor*, 13, 5286-5301; doi:10.3390/s130405286

Apéndices

Apéndice A. Análisis fisicoquímicos realizados al suelo.



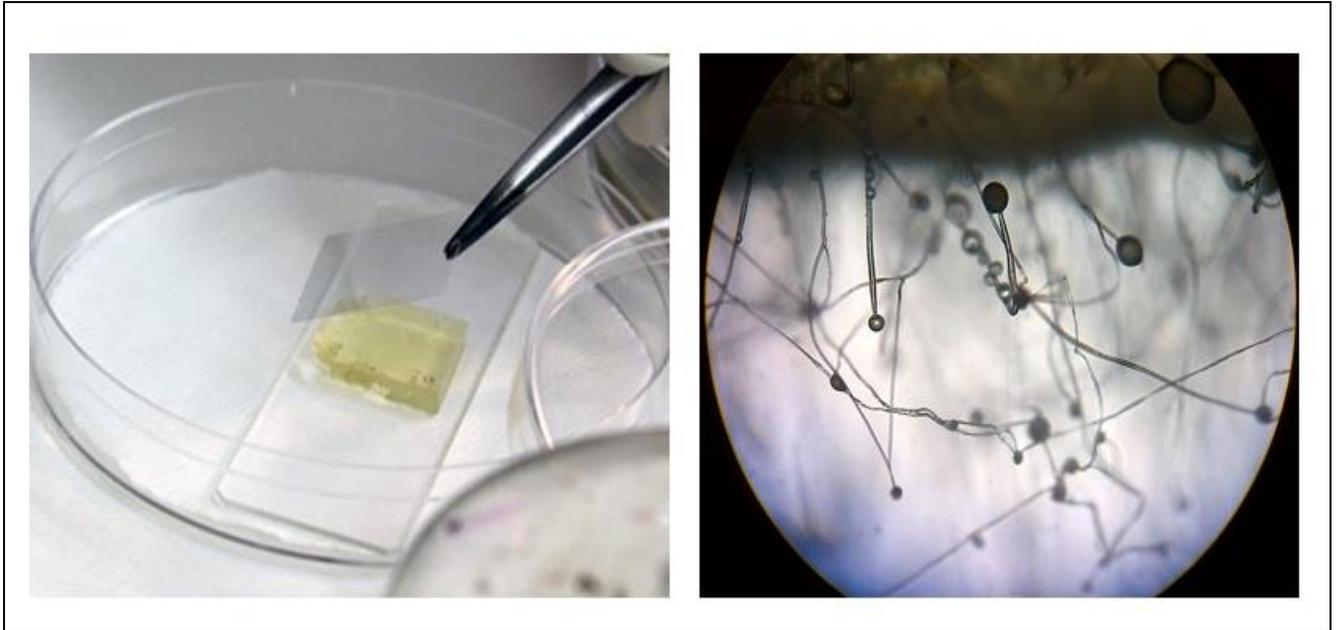
Apéndice B. Identificación de Bacterias por morfología microscopia



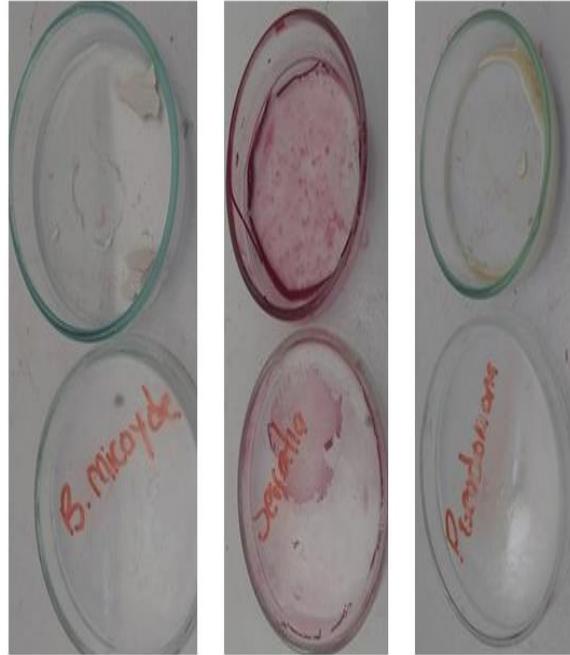
Apéndice C. Identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas convencionales y API 20



Apéndice D. Identificación de hongos por microcultivos



Apéndice E. Liofilización de Microorganismos



Apéndice F. Ficha de seguridad del carbofurano empleado para los ensayos

SIGMA-ALDRICH
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze
Telefon: +49 5137 9238-150

Seelze, 09.12.2013/508374/13/25430

Order-No.:
Customer-No.:
Order-Code:
Quantity:
Production Date: 21.Nov.2013
Expiry Date: 21.Nov.2018

Article/Product: 32056 Batch : SZBD325XV
Carbofuran PESTANAL®

Reference Material (RM)

1. General Information

Formula: C12H15NO3 Molar mass: 221.25 g/Mole
CAS-No.: [1563-66-2] Recomm. storage temp.: roomtemp.
Usage : Insecticide

The estimated uncertainty of a single measurement of the assay can be expected to be 0.5 % relative (confidence level = 95%, n= 6) whereby the assay measurements are calculated by 100% minus found impurities.

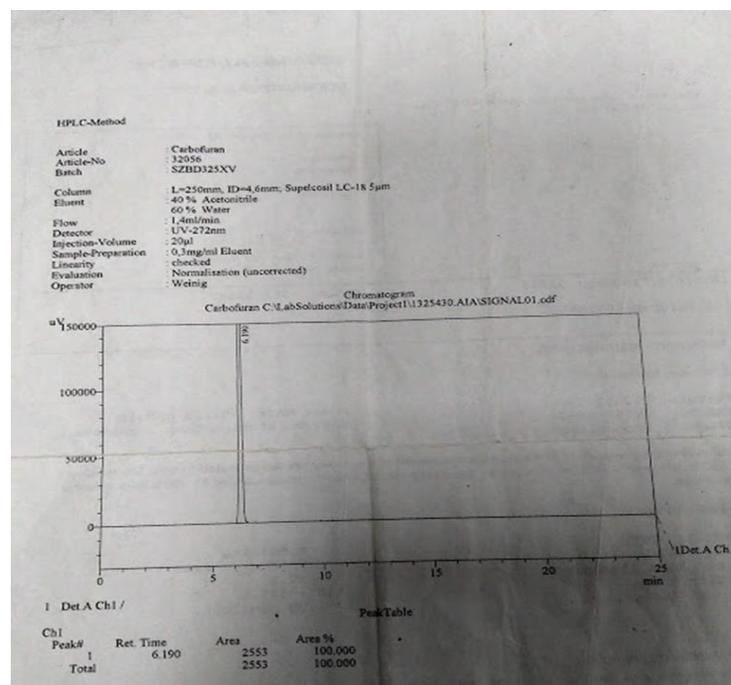
2. Batch Analysis

Identity (NMR)	complying
Assay (HPLC)	99.9 area %
Water (Karl Fischer)	<0.1 %
Melting range	149.4-149.5 °C
Date of Analysis	05.Dec.2013

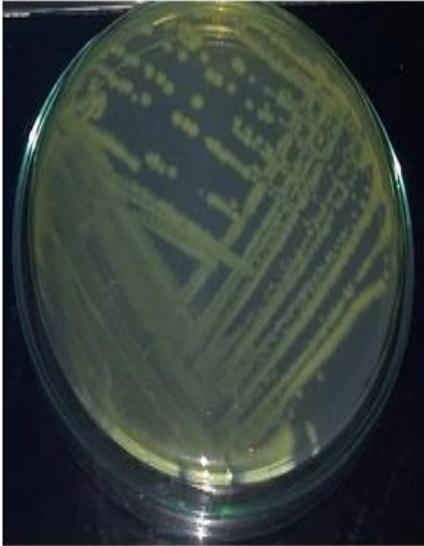
3. Advice and Remarks

- The expiry date is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.
- Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.
- We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.
- Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.
- We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

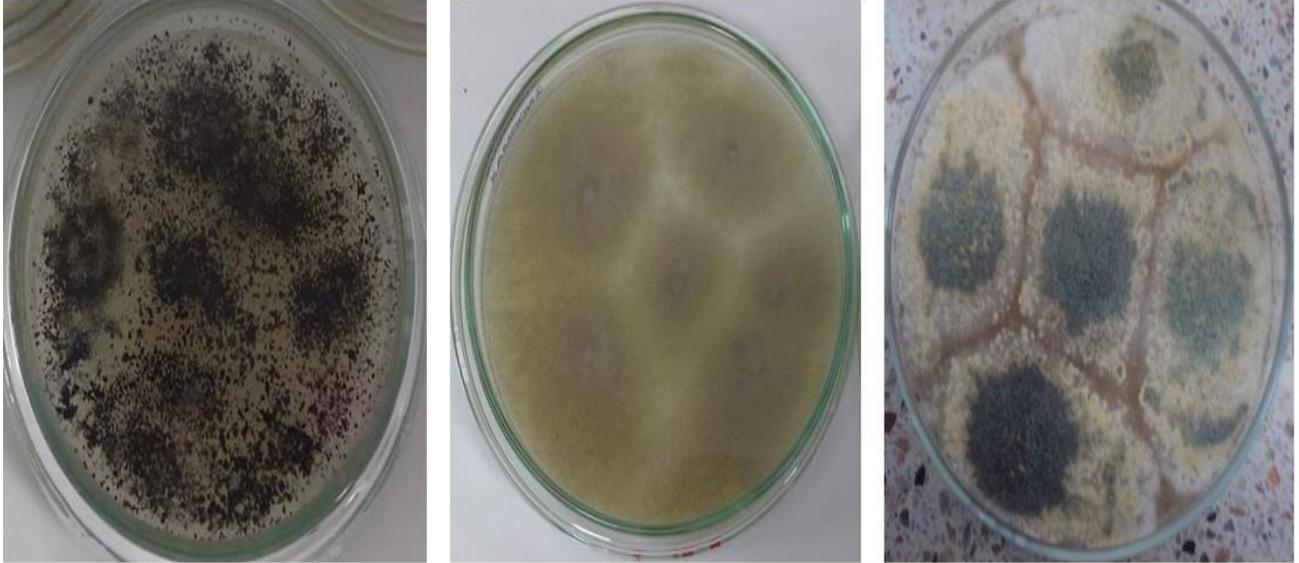
Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH



Apéndice G. Bacterias seleccionadas para ensayos de degradación, cultivadas en agar nutritivo



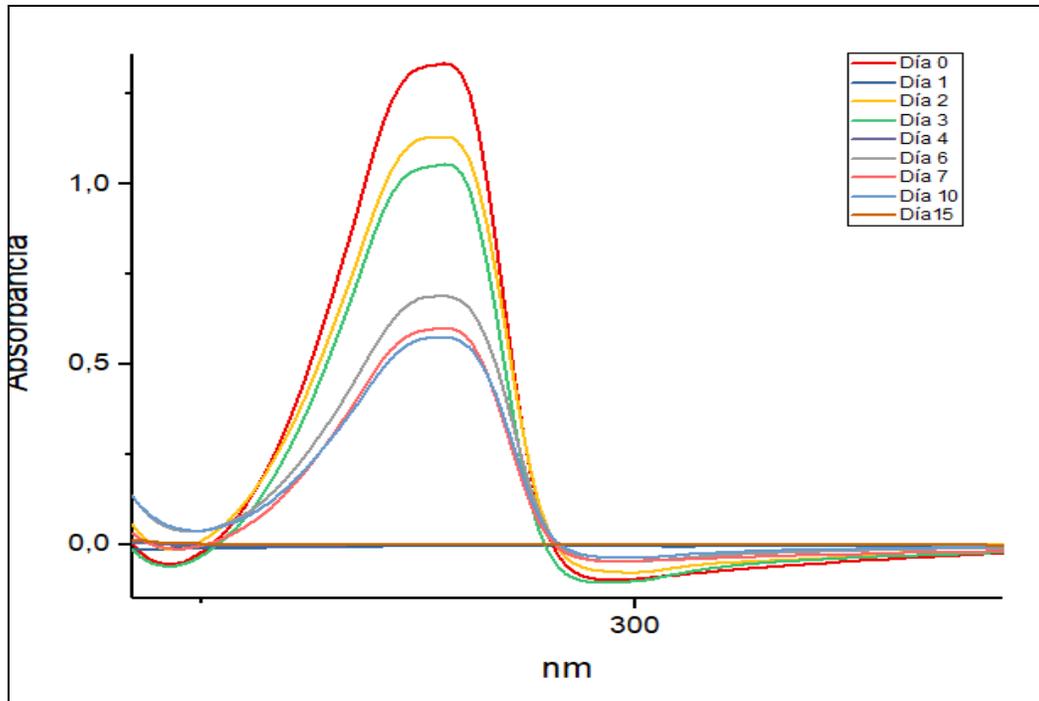
Apéndice H. Hongos seleccionados para ensayos de degradación, cultivadas en agar PDA



Apéndice I. Montajes de ensayos de degradación individual en medio líquido



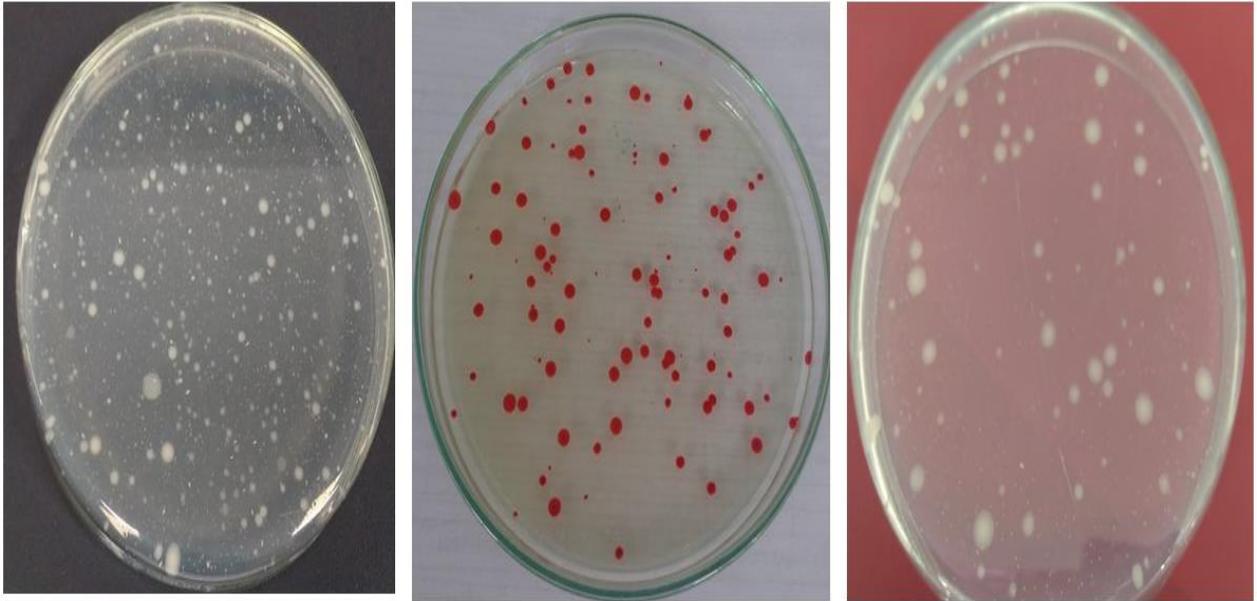
Apéndice J. Espectro UV/VIS del carbofurano a 275 nm, para determinar la capacidad de degradación de *Pseudomonas* sp hacia el pesticida



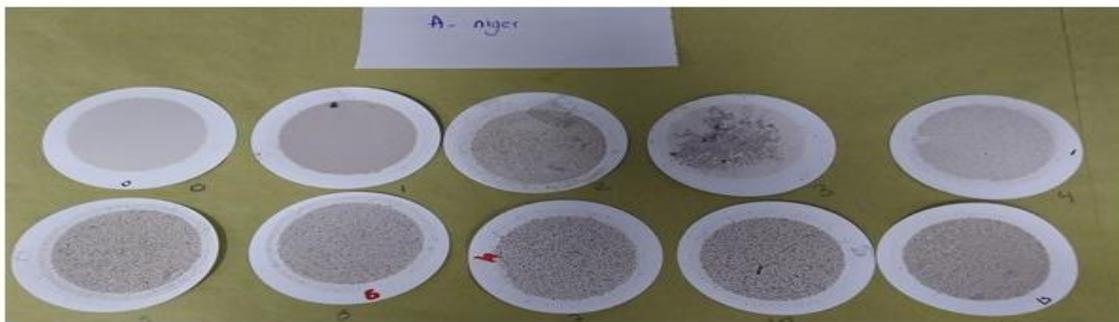
Apéndice K. Modelo de las tablas empleadas para la recolección de datos en los ensayos de degradación individuales.

Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 3			Control: MSN + carbofurano			Control: MSN + microorganismo		
Día	Abs	[]ppm	Día	Abs	[] ppm	Día	Abs	[] ppm	Día	Abs	[]ppm	Día	Abs	[]ppm
Día 0	1,33	100,78	Día 0	1,33	100,78	Día 0	1,3	98,48	Día 0	1,4	106,17	Día 0	0,018	-0,14
Día 1	1,27	96,17	Día 1	1,09	82,32	Día 1	1,06	80,17	Día 1	1,4	106,17	Día 1	0,02	0,02
Día 2	1,1	83,09	Día 2	1,04	78,48	Día 2	1,03	78,02	Día 2	1,35	102,32	Día 2	0,02	0,02
Día 3	1,02	76,94	Día 3	0,96	72,32	Día 3	0,95	71,40	Día 3	1,35	102,32	Día 3	0,02	0,02
Día 4	1	75,40	Día 4	0,94	70,78	Día 4	0,93	70,02	Día 4	1,33	100,78	Día 4	0,02	0,02
Día 5	0,95	71,55	Día 5	0,92	69,25	Día 5	0,74	55,32	Día 5	1,33	100,78	Día 5	0,021	0,09
Día 6	0,89	66,94	Día 6	0,8	60,02	Día 6	0,66	49,25	Día 6	1,3	98,48	Día 6	0,022	0,17
Día 7	0,85	63,86	Día 7	0,76	56,94	Día 7	0,62	46,17	Día 7	1,3	98,48	Día 7	0,022	0,17
Día 10	0,74	55,40	Día 10	0,69	51,55	Día 10	0,54	40,02	Día 10	1,28	96,94	Día 10	0,025	0,40
Día 15	0,61	45,40	Día 15	0,58	43,09	Día 15	0,44	32,32	Día 15	1,27	96,17	Día 15	0,026	0,48

Apéndice L. Evidencia de control de crecimiento bacteriano por determinación de UFC/ml



Apéndice M. Evidencia de control de crecimiento de hongos por determinación del peso sec



Apéndice N. Evidencia de la extracción por MSPD.



Apéndice O. Resultados de la cuantificación de carbofurano por CG/MS.

Día 0	Área	ppm curva	ppm suelo	Promedios
CCD0	2460,36842	15,1149635	151,149635	
E1D0	2442,98326	15,00816	150,0816	150,071576
E2D0	2442,65692	15,0061552	150,061552	
CMD0	0	0	0	
CCD3	2448,075	15,0394405	150,394405	
E1D3	1416	8,69901767	86,9901767	87,3587792
E2D3	1428	8,77273816	87,7273816	
CMD3	0	0	0	
CCD6	2431,07446	14,9349998	149,349998	
E1D6	966,7	5,93879971	59,3879971	60,0729833
E2D6	989	6,07579695	60,7579695	
CMD6	0	0	0	
CCD9	2444,29379	15,0162111	150,162111	
E1D9	520,25	3,19609036	31,9609036	32,0997438
E2D9	524,77	3,22385841	32,2385841	
CMD9	0	0	0	
CCD12	2429,6505	14,9262519	149,262519	
E1D12	254,8	1,56533171	15,6533171	15,3430767
E2D12	244,7	1,50328363	15,0328363	
CMD12	0	0	0	
CCD15	2453,4325	15,0723536	150,723536	
E1D15	131,74	0,8093281	8,09328099	8,23918613
E2D15	136,49	0,83850913	8,38509126	
CMD15		0	0	