

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Biodegradación de carbofurán por bacterias aisladas
de suelos agrícolas. Ayacucho - 2012**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO CON
MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. CHUCHÓN CONDE, EDGAR YONY

AYACUCHO - PERÚ

2013

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

R. D. N. 050-2013-FCB-D

BACH: EDGAR YONY CHUCHÓN CONDE

En la ciudad de Ayacucho siendo las cuatro y diez minutos de la tarde del siete de junio del año dos mil trece, reunidos en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la presidencia del Decano Dr. Tomas Castro Carranza y como miembros del Jurado de Sustentación el Dr. Homero Ango Aguilar, Blgo. Tomas Yuret Miranda Tomasevich, Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez, y la Blga. Ruth Elsa Huamán De La Cruz, actuando como secretaria docente la Blga. Rosa Cortez Saavedra en mérito a la R.D.N° 056-2013-UNSC-FCB-D de fecha 08 de mayo del presente año, quienes recepcionaron la sustentación de la tesis titulada: **Biodegradación de carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Ayacucho – 2012**, presentada por el Bachiller en Ciencias Biológicas Edgar Yony Chuchón Conde quien pretende optar el título profesional de Biólogo con mención en la especialidad de Microbiología.

Luego de verificar la documentación correspondiente el Sr. Decano instruye al sustentante respecto a la exposición de la investigación para lo cual cuenta con cuarenticinco minutos según el reglamento.

Concluida la etapa de exposición del sustentante, el Sr. Decano invita a los miembros del Jurado de Sustentación a realizar las preguntas o aclaraciones que creen conveniente. Concluida la etapa de las preguntas y aclaraciones formuladas por los miembros de Jurado de Sustentación, el presidente del Jurado invita al señor sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, para que los miembros del Jurado de Sustentación puedan deliberar y calificar el trabajo de investigación en privado, arribándose al siguiente resultado.

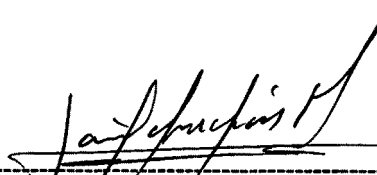
Miembros del Jurado	Exposición	Rpta a preguntas	Promedio
Blgo. Tomas Yuret Miranda Tomasevich	19	18	19
Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez	19	18	19
Blga. Ruth Elsa Huamán De la Cruz	18	18	18
		Promedio	19

Luego de concluida la etapa de calificación el sustentante ha obtenido la calificación promedio aprobatorio de diecinueve (19) de la cual dan fe los miembros del Jurado de Sustentación estampando sus firmas al pie del presente.

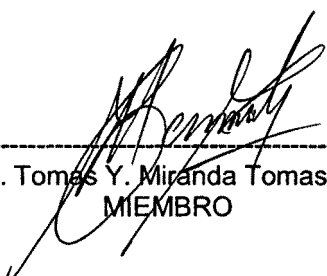
Siendo las cinco y cincuenticinco minutos de la tarde se dio por concluida el presente acto académico.



Dr. Tomas Castro Carranza
PRESIDENTE




Dr. Saúl A. Chuchón Martínez
MIEMBRO – ASESOR



Blgo. Tomas Y. Miranda Tomasevich
MIEMBRO



Blga. Ruth E. Huamán De la Cruz
MIEMBRO



Biga. Rosa E. Cortez Saavedra
SECRETARIA DOCENTE

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres Ezequiel y
Maximina.

A Luma.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga *alma mater*, quien me acogió durante mi formación profesional.

A los Docentes del Departamento Académico de Ciencias Biológicas quienes me brindaron los conocimientos y enseñanzas durante mi formación profesional.

Al Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez, por haberme inculcado los principios de la microbiología ambiental, por su asesoramiento y paciencia en la ejecución del presente trabajo de tesis.

A cada una de las personas que directa o indirectamente colaboraron en mi formación profesional y ejecución de presente trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	04
2.1. Antecedentes	04
2.2. Marco conceptual	06
2.3. Bases teóricas	07
2.3.1. Evolución de los plaguicidas	07
2.3.2. Clasificación de los plaguicidas	10
2.3.3. Carbofurán	12
2.3.4. Persistencia de los plaguicidas	14
2.3.5. Efectos en la salud de los plaguicidas	16
2.3.6. Efectos en el medio ambiente de los plaguicidas	18
2.3.7. Biodegradación de plaguicidas	20
2.3.8. Metabolismo de plaguicidas en plantas y microorganismos	21
2.3.9. Factores que afectan la biodegradación de los plaguicidas	25
2.3.10. Géneros de bacterias degradadoras de los plaguicidas	27
2.4. Marco legal	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Localización de la zona de estudio	32
3.2. Muestra y sistemas de muestreo	33
3.3. Métodos para la recolección de datos	33
3.4. Análisis de datos	38
IV. RESULTADOS	39
V. DISCUSIÓN	52
VI. CONCLUSIONES	61
VII. RECOMENDACIONES	62
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según organismo objetivo.	10
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según DL ₅₀ y vías de contacto.	11
Tabla 3. Características de los plaguicidas.	12
Tabla 4. Usos y dosis de carbofurán (Furadán®).	14
Tabla 5. Características y fases del metabolismo de insecticidas.	22
Tabla 6. Actividad metabólica de plaguicidas en plantas y microorganismos.	24
Tabla 7. Géneros de microorganismos heterótrofos que usan plaguicidas.	28
Tabla 8. Composición del ensayo de aislamiento de bacterias biodegradadoras de carbofurán de suelos agrícolas.	34
Tabla 9. Valores del recuento de carga bacteriana en ensayos de aislamiento de las bacterias biodegradadoras de carbofurán.	40
Tabla 10. Características culturales y test Gram de cepas bacterianas con capacidad biodegradadora de carbofurán.	41
Tabla 11. Identificación de bacterias degradadoras de carbofurán aisladas de suelos agrícolas.	42
Tabla 12. Estandarización de la curva patrón para la cuantificación de carbofurán.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Creación artística que ilustra la aplicación de plaguicidas en la antigüedad.	8
Figura 2. Fórmula global de carbofurán.	13
Figura 3. Procesos que afectan los plaguicidas en el medio ambiente.	16
Figura 4. Dinámica de los plaguicidas en el organismo.	18
Figura 5. Fumigación aérea a gran escala de pesticidas.	19
Figura 6. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 10 mg/l según días transcurridos.	44
Figura 7. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 20 mg/l según días transcurridos.	45
Figura 8. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 30 mg/l según días transcurridos.	46
Figura 9. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 40 mg/l según días transcurridos.	47
Figura 10. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 50 mg/l según días transcurridos.	48
Figura 11. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 60 mg/l según días transcurridos.	49
Figura 12. Porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano en relación a diferentes tratamientos.	50
Figura 13. Cantidad total de carbofurán degradado en relación a diferentes tratamientos.	51

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Mapa del uso actual del territorio regional de Ayacucho y zona de muestreo.	69
Anexo 2 Modo de aplicación del plaguicida en el cultivo de <i>Solanum sp.</i> "papa".	70
Anexo 3 Terrenos agrícolas del Distrito de Chiara.	71
Anexo 4 Rendimiento de cultivos campaña agrícola del Distrito de Chiara.	72
Anexo 5 Terreno de cultivo de <i>Solanum sp</i> "papa" como sitios de muestreos.	73
Anexo 6 Composición del medio de cultivo Busnell Hass.	74
Anexo 7 Representación comercial de carbofurán (Furadán 4F).	75
Anexo 8 Agitador horizontal de frascos de vidrio.	76
Anexo 9 Sitio de experimentación para aislamiento y biodegradación de carbofurán.	77
Anexo 10 Colonias sobre agar Busnell Hass enriquecido con carbofurán.	78
Anexo 11 Observación microscópica de la coloración Gram de las bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán.	79
Anexo 12 Curva y ecuación del patrón estandarizada.	80
Anexo 13 Tubos de prueba de resultados de reacción cromogénica de DAPSONA.	81
Anexo 14 Flujograma del ensayo de biodegradación de carbofurán	82
Anexo 15 Reacciones químicas de carbofurán con DAPSONA en el medio alcalino.	83
Anexo 16 Representación y características de DAPSONA.	84
Anexo 17 Valores de carbofurán en mg/l en diferentes tratamientos de carbofurán según repeticiones de biodegradación.	85
Anexo 18 Valores de absorbancia en relación a diferentes concentraciones de carbofurán según repeticiones de biodegradación.	86
Anexo 19 Análisis de varianza de la biodegradación de carbofurán	87
Anexo 20 Resumen del procesamiento de los casos del ensayo de biodegradación de carbofurán.	88
Anexo 21 Matriz de consistencia.	89

RESUMEN

La actividad agrícola en la zona de Chiara está sometida al uso constante de agroquímicos principalmente de insecticidas (carbofurán), lo cual con el tiempo genera graves problemas en la salud del hombre y la estabilidad ambiental. Ante esta situación es necesario generar alternativas para el tratamiento de residuos de estos productos. La presente investigación tiene como objetivo principal evaluar la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas de Chiara, en condiciones de laboratorio. La investigación es de tipo básica, nivel descriptivo, diseño transversal - analítico. La toma de muestra se realizó en suelos agrícolas contaminados con carbofurán por método no probabilístico o por conveniencia en la localidad de Chiara, durante los meses de agosto y setiembre de 2012. A partir de tales muestras se aislaron bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán utilizando caldo Busnell Hass con 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l de carbofurán (medio líquido), seguido en agar Busnell Hass con 30 mg/l de carbofurán, (medio sólido), posteriormente purificadas en agar nutritivo e identificadas mediante características culturales, microscópicas y bioquímicas. El ensayo de biodegradación de carbofurán se realizó con tratamientos a 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/l de carbofurán por un periodo de 30 días y evaluadas con la técnica cromogénica de DAPSONA, en la cual se obtuvieron resultados que muestran una biodegradación hasta 83%, 61%, 51%, 50%, 41% y 22% respectivamente, resulta a la vez la influencia de concentraciones de carbofurán sobre la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano, lo cual fue contrastada por análisis de varianza. En conclusión, el consorcio bacteriano aislado de suelos agrícolas de Chiara con capacidad biodegradadora de carbofurán está integrado por los géneros: Bacillus, Pseudomonas, Flavobacterium, Klebsiella, Serratia, Proteus, Corynebacterium, Micrococcus, Aeromonas, Citrobacter y dos cepas no identificadas; quienes han logrado una máxima biodegradación en los tratamientos 40 mg/l y 50 mg/l hasta 18,6 mg y 20,9 mg de carbofurán respectivamente, logrando mayor biodegradación en los 10 primeros días de incubación.

Palabras claves: plaguicidas, carbofurán, consorcio bacteriano, biodegradación.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la sociedad contemporánea en las últimas décadas está asociado al uso de compuestos sintéticos conocidos como xenobióticos, los cuales entran directa o indirectamente al ambiente, contaminando y generando problemas en la salud del hombre. Agentes xenobióticos como los plaguicidas, son ampliamente utilizados en la agricultura de todo el mundo debido a su alta rentabilidad.¹ Pero a la vez el uso de diversas plaguicidas, sin negar su contribución al incremento de la productividad agrícola a nivel mundial, contribuye a la contaminación ambiental, afectando principalmente cuerpos de agua debido al uso indiscriminado e inadecuado de ellos, generando un grave desequilibrio en los ecosistemas.²

La presencia de residuos y/o metabolitos de plaguicidas en el alimento, agua, aire y suelo representa actualmente uno de los temas importantes para la química ambiental.³ Existe una gran variedad de métodos físicos y químicos para tratar los suelos y mantos acuíferos contaminados por estas sustancias, pero muchos de estos tratamientos no destruyen los compuestos peligrosos sino que los transfieren de una fase a otra, por lo que el tratamiento biológico en el que se transforman estos compuestos peligrosos en compuestos más simples sigue siendo un desafío importante en la actualidad.⁴ La presencia de bacterias

capaces de metabolizar los diferentes insecticidas ha recibido una especial atención, debido a que han sido el resultado de un proceso de evolución de poblaciones microbianas autóctonas que se han adaptado a estos contaminantes y porque proveen la posibilidad de ser usadas *in situ* en la detoxificación de ambiente severamente contaminados.⁵

La presente investigación logró evaluar la capacidad biodegradadora de carbofurán utilizando el consorcio bacteriano aislado de suelos agrícolas de la localidad de Chiara, provincia de Huamanga de la región de Ayacucho, donde según los datos de Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) en 2011 y Dirección Regional de Agricultura (DRA) en 2011 se han registrado el uso indiscriminado de agroquímicos en la actividad agropecuaria al igual que en otras zonas agrícolas del mundo. La actividad agrícola con dependencia de agroquímico hace que existan residuos de estas sustancias (carbofurán) a nivel de tierras de cultivo, agua, aire e incluso a nivel de la composición de los productos alimenticios, lo que genera problemas en la productividad de las actividades agropecuarias, equilibrio ecológico y ponen en riesgo la salud pública no solamente a nivel de la localidad de Chiara sino también a nivel regional y nacional, a través del consumo y comercialización de alimentos básicos (*Solanum sp.* "papa"). Pero a la vez, la presencia de residuos de estas pesticidas en el medio ambiente permite que existan microorganismos (bacterias) con capacidad biodegradadora de sustancias tales como carbofurán. El aislamiento, identificación y el conocer la capacidad biodegradadora es una investigación básica, nivel descriptivo, diseño transversal - analítico en condiciones de laboratorio que forma parte esencial para el desarrollo de un gran proyecto de biorremediación de suelos agrícolas contaminados con agroquímicos no solamente en la zona de Chiara sino a nivel regional y nacional.

Teniendo en cuenta las consideraciones indicadas en los párrafos anteriores, se ha planteado como:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Ayacucho 2012.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar bacterias con capacidad biodegradadora del carbofurán de suelos agrícola. Ayacucho 2012.
- Identificar los principales géneros de bacterias con capacidad biodegradadora del carbofurán aisladas de suelos agrícolas. Ayacucho 2012.
- Determinar la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Ayacucho 2012.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Mpogo⁶ realizó la caracterización metodológica y degradación bacteriana del carbofurán de las tierras de granjas hortícolas en el Valle de la Hendedura y Kenya Central, donde aislaron bacterias a partir de tierras probadas de las granjas hortícolas con una historia de uso del pesticida, en tal trabajo se utilizaron la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para determinar la cantidad de insecticidas utilizadas.

Castrejón *et al.*⁷ realizaron la caracterización e identificación de los consorcios bacterianos capaces de crecer sobre plaguicidas organofosforados; donde muestran la biodegradación con bacterias aisladas de sitios expuestos a estos xenobióticos. El consorcio bacteriano estaba compuesto por 11 especies de bacterias, seis con capacidad de crecer en presencia de paratión metílico y cinco para cadusafos. Las especies identificadas son: *Bacillus brevis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Weeksella virosa*, *Flavobacterium odoratum*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*.

Durante el 2008 Gómez *et al.*⁸ aislaron 53 cepas bacterianas nativas a partir de muestras de sedimento y agua del complejo lagunar de la Ciénaga Grande de Santa Marta, capaces de tolerar plaguicida organoclorados (aldrin) en condiciones aeróbicas. A partir de éstas se preparó el inóculo para realizar bioensayos con el fin de seleccionar un consorcio con capacidad de degradar una concentración mayor de aldrin durante un mes. El consorcio bacteriano estuvo conformado por: *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *Enterobacter cloacae*, las cuales tuvieron la capacidad de degradar el aldrin en un 50,9%, donde el 30,9% se debió a factores externos (abióticos) mientras, el 20% restante fue atribuido a la degradación bacteriana.

En el año 2004, Carrillo *et al.*⁹ realizaron el aislamiento y evaluación del consorcio mixta de microorganismo con capacidad para degradar Dicloro Difetil Tricloroetano (DDT) en los cuales hicieron el muestreo de agua, suelo y sedimento contaminado de la región de valle de Yaqui de Sonora México, en tales se prosiguió aislar en medio mineral enriquecido con DDT en la cual las bacterias Gram negativo eran los principales protagonistas de la degradación de DDT, pertenecientes de los géneros: *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*.

Los trabajos antecedentes a nivel nacional y regional del presente investigación son pocas, tales como el trabajo de investigación de Quispe ejecutado en 2001, pero publicado en el año 2004, quien identificó las bacterias de los géneros: *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Agrobacterium* con capacidad biodegradadora de pesticidas organofosforados y carbamatos en condiciones de laboratorio, teniendo como muestra suelos agrícolas con historial de uso de estos plaguicidas en las localidades de Matará, Sachabamba y Muyurina.¹⁰

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Xenobióticos

Se denomina compuestos xenobióticos (“xeno”: extraño, “bio”: vida), a los compuestos sintetizados en los laboratorios y que no se encuentra en su forma natural en el ambiente. Estos compuestos en general muy estables y apolares, tienden a acumularse en los tejidos de los seres vivos, tardan largo tiempo en degradarse en los sistemas naturales y pueden actuar como contaminantes. Los xenobióticos son utilizados en química orgánica, generalmente en la industria de plásticos, agricultura (pesticidas) y combustibles.¹¹

Agentes xenobióticos como los plaguicidas, son ampliamente utilizados en la agricultura de todo el mundo debido a su alta rentabilidad. Más del 55% de la tierra usada para la producción agrícola en países en desarrollo usa cerca del 26% del total de plaguicidas producidos en el mundo. A tal forma el coeficiente de uso de estas sustancias dentro de países en vías de desarrollo es considerablemente más alto que el de los países desarrollados.¹

2.2.2. Plaguicida

La denominación de plaguicida, incluye una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y propiedades a pesar de su utilización común. Para Codex Alimentarius se entiende por plaguicida, “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, agentes para reducir

la densidad de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento.¹²

Hoy día no se puede pensar en prescindir de los plaguicidas, sobre todo en la explotación agropecuaria, donde las plagas constituyen uno de los factores que ocasionan mayores pérdidas económicas, disminuyendo el rendimiento con el consiguiente aumento de los costos de producción. Los plaguicidas constituyen el mayor grupo de sustancias tóxicas que están siendo diseminadas por el hombre en nuestro medio ambiente. Por lo antes expuesto, es muy importante el rol de las autoridades tanto sanitarias como agropecuarias y de la población en general en la comercialización, manejo, uso y control de los plaguicidas.¹³

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Evolución de los plaguicidas

Los plaguicidas han sido utilizados en cierta manera desde tiempos muy remotos.¹⁴ El papiro de Ebers, escrito sobre el año 1550 a. C. recoge la utilización de ciertos preparados “médicos o farmacéuticos” que se utilizaban para repeler insectos de las casas. Incluso Homero (1000 a. C.) menciona en la Odisea la quema de azufre para “purgar las casas, las habitaciones, etc.” Dioscórides, médico griego (40-90 a. C.) ya conocía las propiedades tóxicas del azufre y del arsénico. Hay evidencias de que incluso alrededor del año 900 a. C. los chinos utilizaban arsenicales para eliminar insectos de los jardines. Los romanos, por su parte, utilizaban dos especies de plantas (*Veratrum album* y *V. nigrum*, pertenecientes a la familia de las liliáceas) como raticidas.¹⁵

La evidencia más antigua que se tiene en occidente del uso de pesticidas, data de 1669, cuando se utilizaron arsenicales como insecticidas para eliminar plagas de hormigas en mieles. Por otro lado, el uso de compuestos de cobre como

fungicidas se conoce desde 1807, mientras que el ácido cianhídrico, por ejemplo, ya conocido por los egipcios y romanos como un potente veneno, fue utilizado a partir de 1877 para fumigar los museos que guardaban colecciones de insectos.¹⁶



Figura 1. Creación artística que ilustra la aplicación de plaguicidas en la antigüedad.¹⁴

Hasta mediados de los años treinta, los plaguicidas utilizados eran de origen natural o bien compuestos inorgánicos. La *Nicotiana tabacum* "tabaco" fue y todavía es utilizado en muchos países como insecticida. El azufre, por ejemplo, se empezó a utilizar con bastante frecuencia a principios del siglo XIX, época en la que ya se conocían sus propiedades como pesticida y, a pesar de la aparición de pesticidas organosulfurados como el captan, maneb u otros a finales de la década de los 50, todavía hoy es utilizado con frecuencia dada su baja toxicidad comparada con otro tipo de compuestos.¹⁶

Los primeros pesticidas de síntesis orgánica aparecieron a principios de la década de los 30 y contenían grupos nitrogenados y tiocianatos. Entre 1935 y 1950 aparecieron los plaguicidas organoclorados, entre los que se encuentra el DDT que, aunque fue sintetizado por Zeidler en 1874, no fue hasta 1939 cuando el Dr. Paul Muller descubrió su uso como insecticida, por el que le dieron el Premio Nobel de medicina en 1948. Desde entonces el DDT fue ampliamente

utilizado para la eliminación de plagas y fue de gran utilidad para erradicar enfermedades como el tifus o la malaria en muchos países. Con la aparición de la cromatografía de gases en 1962, se pudo comprobar la presencia de residuos de plaguicidas clorados en toda la superficie terrestre, sobre todo de DDT, de ahí que a partir de 1970 fuera prohibido su uso por su alta persistencia, su capacidad de acumulación en tejidos grasos y su alta toxicidad, aunque todavía hoy se encuentran restos de DDT en muestras de diversa índole.¹⁶

Por otro lado, entre 1940 y 1970 aparecieron los compuestos organofosforados y los carbamatos, que presentan menor persistencia medioambiental que los anteriores, y que han sido utilizados hasta nuestros días. Quizás, el grupo de pesticidas más importante de reciente introducción sean los piretroides o piretrinas sintéticos, muchos de los cuales se encuentran, de forma natural, presentes en las flores de *Chrysanthemum cinerariifolium* "crisantemo" y otros.¹⁷

Aunque hasta el momento son muchas las familias de pesticidas existentes, se están desarrollando los denominados biopesticidas o pesticidas bioquímicos que son sustancias naturales capaces de controlar plagas por mecanismos que no implican una vía tóxica como los anteriores. En este grupo de compuestos se incluyen las feromonas que son utilizadas para atraer insectos hacia trampas adecuadas. Debido a la dificultad existente para poder asegurar que un determinado producto es efectivamente un biopesticidas, la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA), entre otros organismos, ha designado comités especiales con este fin. Por otro lado, la ingeniería genética también ha generado especies vegetales resistentes a ciertas plagas, de forma que estos vegetales sean capaces de sintetizar sustancias capaces de combatirlas.¹⁶

2.3.2. Clasificación de los plaguicidas

Actualmente, la clasificación de los pesticidas se puede hacer en función de diferentes criterios como su campo de acción, grado de penetración, estabilidad, toxicidad, semejanza química, etc. Una clasificación bastante extendida en su uso diario es la generada atendiendo al objetivo o campo de acción al que están destinados. Siguiendo este criterio, la EPA,¹⁷ entre otros, clasifica a los pesticidas tal como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según organismo objetivo.¹⁷

Tipo de plaguicida	Organismo objeto
Acaricidas	Ácaros
Alguicidas	Algas
Fumigantes	Plagas en edificios
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Plantas
Insecticidas	Insectos
Larvicidas	Larvas de insectos
Molusquicidas	Caracoles, babosas
Nematicidas	Nematodos
Raticidas	Roedores

La Organización Mundial de Salud (OMS)¹² por su parte, recomienda clasificar a los pesticidas en función de su toxicidad, atendiendo a dos posibles vías de contacto (oral y tópica) y a la formulación del producto (sólido o líquido), tal como muestra la Tabla 2. Un indicador de la toxicidad de un compuesto puede ser la DL₅₀, dosis letal, que es la cantidad susceptible de provocar la muerte de un 50% de los animales de experimentación, esto generalmente *Rattus rattus* "rata".

Extrapolando los valores obtenidos en animales a las personas, pueden estimarse unas DL₅₀ aproximadas para los seres humanos. Aunque lógicamente

existe un margen de error en esta extrapolación, los valores obtenidos dan una orientación sobre la toxicidad del producto en su utilización práctica.¹⁷

Es importante destacar, que las DL₅₀ representan una medida de la toxicidad aguda, pero el peligro de ingerir una dosis superior a las DL₅₀ sólo ocurre normalmente por error, accidente, ignorancia o suicidio. Desde el punto de vista de los residuos de estos compuestos, interesa mucho más su toxicidad a corto y medio plazo (toxicidad subcrónica) y sobre todo a largo plazo (toxicidad crónica, como es el caso del desarrollo de un cáncer, por ejemplo), que se averigua también con otros ensayos en diferentes animales.¹⁶

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según DL₅₀ y vías de contacto.¹²

Clasificación	DL ₅₀ en ratas (mg/kg de peso del animal)			
	Vía oral		Vía tópica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Extremadamente tóxicos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Altamente tóxicos	5-50	20-200	10-100	40-400
Moderadamente tóxicos	50-500	200-2 000	100-1 000	400-4 000
Ligeramente tóxicos	>500	>2 000	>1 000	>4 000

Otras clasificaciones extendidas es la que se realiza en base a la estructura química, motilidad y destino de su aplicación.¹⁷

a) **Por su movilidad**, pueden ser sistémicos o de contacto; los primeros se aplican sobre una parte de la planta, ingresan a ellas y a través del follaje llegan a otras partes que no fueron tratadas.

b) **Según el destino de su aplicación**, pueden ser de uso fitosanitario, ganadero, doméstico, para la higiene personal o para la industria alimentaria.

c) De acuerdo con su estructura química, se los agrupa en carbamatos, organoclorados, organofosforados, compuestos inorgánicos, piretroides, derivados de la urea, arsenicales, bupiridilos y muchos otros.¹⁷

Tabla 3. Características de los plaguicidas.¹⁷

Plaguicida	Características	Ejemplo
Organoclorados	Solubles en lípidos; se acumulan en los tejidos grasos de los animales; son transferidos a través de la cadena alimenticia; tóxicos para una gran variedad de animales; persistentes a largo plazo.	DDT Aldrín Lindano Clordan
Organofosforados	Solubles en agua; se infiltran hasta alcanzar las aguas subterráneas; menos persistentes que los hidrocarburos clorados;	Malatión Paratión
Carbamatos	Derivados de ácidos carbamáticos; matan a un espectro limitado de insectos, pero son altamente tóxicos para los vertebrados; persistencia relativamente baja.	Sevin®, Carbofurán Furadan®
Diflubenesurón	Interfiere en la formación del exoesqueleto en las larvas de insectos que mudan. Se ha utilizado en el control de lepidópteros que están en fase de desarrollo en el momento de la aspersión.	Dimelín

2.3.3. Carbofurán

El carbofurán o carbofurano es un plaguicida sistémico utilizado como insecticida, acaricida y nematocida de amplio espectro, que pertenece al grupo químico de los carbamatos. Conjuntamente con los insecticidas organofosforados, los compuestos piretroides y otros carbamatos, el carbofurano integra un grupo sustituto de insecticidas persistentes como el DDT, clordano y

heptacloro. Su nombre químico (IUPAC) es 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato y su fórmula química: $C_{12}H_{15}NO_3$.¹⁸

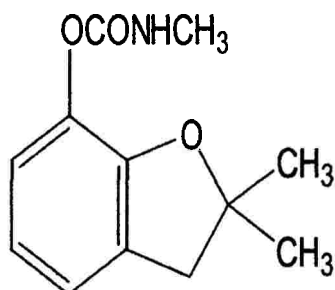


Figura 2. Fórmula global de carbofurán.¹⁸

A temperatura ambiente el carbofurano es un sólido cristalino, de color blanco o gris, en forma de gránulos (similar a la arena). Es inodoro o con ligero olor fenólico, y una solubilidad en el agua que llega a 700 mg/l a 25 °C. Si bien es muy poco soluble en los solventes convencionales utilizados en las formulaciones de uso agrícola, presenta solubilidades elevadas en diversos solventes orgánicos. Los propios distribuidores advierten que es tóxico, y peligroso para salud y medio ambiente.¹⁸

a) Usos

Se usa para el control de insectos y nemátodos de una gran variedad de cultivos, especialmente *Zea mays* "maíz", *Triticum sativum* "trigo", *Oryza sativa* "arroz", *Glycine max* "soya", *solanum tuberosum* "papa", *Helianthus annuus* "girasol", frutas (*Cucumis melo* "melón") y hortalizas, entre muchos otros. En Argentina, ha sido utilizado para eliminar aves que se alimentan de cultivos anuales y perennes, aplicándolo en sus nidos.¹⁷ Se comercializa en distintas formulaciones con los nombres de Carbofurán, Carbodán, Curater, Furadán®, etc. Se aplica al suelo incorporado al agua de riego.¹⁹

Tabla 4. Usos y dosis de carbofurán (Furadán®).²⁰

Cultivo	Plagas		Dosis		P.C. (días)	L.M.R. (ppm)
	Nombre común	Nombre técnico	ml/cil	ml/moch		
Papa	"gorgojo de los andes"	<i>Premnotrypes suturicallus</i> ,				
	"pulguilla saltona"	<i>Epitrix subcrinita</i>	500	50	60	1
	"mosca Cecidomide"	<i>Prodiplosis longifila</i> ,				
Tomate	"pulgón"	<i>Myzus persicae</i>	500	50	60	0,1
Zapallo	"perforador de frutos"	<i>Diaphania nitidalis</i>	500	50	60	0,6
Flor	"mosca cecidomide"	<i>Prodiplosis longifila</i>	500	50	60	1
Plátano	"gorgojo negro"	<i>Cosmopolites sordidus</i>	400	40	60	0,1

b) Modo de acción

Actúa interfiriendo los impulsos nerviosos por inhibición de la acetilcolinesterasa e ingresa en los organismos principalmente por contacto e ingestión, y en menor medida por inhalación. Su efecto sistémico, al ser absorbido por las raíces de las plántulas, le confiere acción de ingestión sobre pulgón e insectos de las partes aéreas.²⁰

2.3.4. Persistencia de los plaguicidas

Los plaguicidas son contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica; por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada. La aplicación de plaguicidas sintéticos ha sido una práctica rutinaria en la agricultura en los últimos 50 años. El uso indiscriminado que se da de estos compuestos, ha producido que en la actualidad se detecten residuos de estos en el ambiente y se asocien con riesgo potencial a la salud pública.²¹

Actualmente, los residuos de estos plaguicidas han sido identificados en todos los compartimientos ambientales (aire, agua y suelo), en todas las regiones geográficas incluyendo aquellas muy remotas al sitio original de su liberación

ambiental, como océanos, desiertos y zonas polares. Igualmente se ha demostrado su presencia en organismos de todos los niveles tróficos, desde el plancton hasta las ballenas y los animales del ártico. Estos compuestos se bioacumulan en numerosas especies y se han biomagnificado a través de todas las redes tróficas del mundo. Los seres humanos no están exentos de esta contaminación y los plaguicidas se han podido identificar en diversos tejidos y secreciones humanos, inclusive de los habitantes de regiones muy aisladas.²¹

El carbofurán posee una vida media en suelos de 30 a 60 días. Se degrada principalmente por acción microbiológica, generando dióxido de carbono.²² La persistencia ambiental del carbofurán está controlada por su degradación por vías química, fotoquímica y bioquímica. La primera de ellas está eminentemente asociada a la hidrólisis, con tiempos de vida media para este mecanismo de reacción comprendidos entre dos días, a pH=9,5 y 1,7 días, a pH=5,2 teniendo influencia directa la temperatura sobre la tasa de hidrólisis, además del pH. La fotólisis directa y la fotooxidación por el mecanismo de radicales libres constituyen una importante vía de degradación del carbofurán, habiéndose observado en estudios de laboratorio una fotodescomposición significativa dentro de 96 horas.²²

Este plaguicida tiene baja adsorción en el suelo, varía su tiempo de vida media entre varios días y más de tres meses. La escasa retención en el suelo y su relativamente alta solubilidad acuosa determinan una migración considerable del carbofurán hacia el agua ambiente, donde el tiempo de vida medio está fuertemente influenciado por el pH.²²

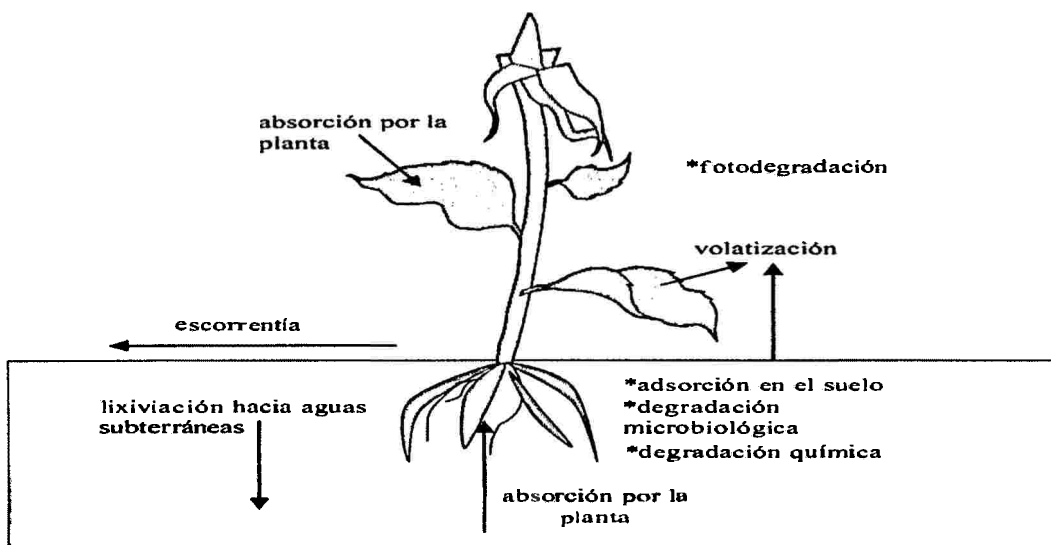


Figura 3. Procesos que afectan los plaguicidas en el medio ambiente.²²

Maldonado y Martínez ²⁰ en 2007 reportaron persistencia máxima variando entre 10 y 21 horas para lagunas naturales con un pH próximo a 8,5. Debido a su alta movilidad, el carbofurano también puede percolar hacia aguas subterráneas, donde puede persistir más prolongadamente en condiciones de temperatura y pH bajos.

2.3.5. Efectos en la salud de los plaguicidas

Los seres humanos pueden absorber el carbofurán por inhalación, por ingestión, por la piel y a través de los ojos. La EPA destaca el peligro de intoxicación aguda que presenta este plaguicida a las personas expuestas a su acción. Señala que, como es altamente tóxico, la exposición a las más pequeñas cantidades de esta sustancia química genera un riesgo importante. Por eso, considera que el riesgo de residuos de carbofurano en los alimentos es preocupante para todos los subgrupos de la población, especialmente para los niños de entre uno y dos años de edad. La exposición a través del agua potable es un riesgo adicional para los consumidores de fuentes específicas y vulnerables, en especial las asociadas a determinados tipos de suelo y modos de uso del plaguicida. Así

mismo, la EPA advierte que también son preocupantes los riesgos ocupacionales, aun cuando se adopten medidas estrictas de protección.¹⁹

a) Toxicidad aguda

La Organización Mundial de la Salud clasifica al carbofurán en el grupo identificado como 1b, lo que significa "altamente peligroso". Sin embargo, en el caso de ingestión en forma directa o de residuos existentes en alimentos, es "extremadamente tóxico".¹²

Este plaguicida puede producir irritaciones en la piel y, según la vía por la cual ingresa en el organismo humano, afecta el sistema respiratorio, el aparato digestivo y ojos. A niveles más altos de exposición puede causar espasmos musculares, pérdida de coordinación y paro respiratorio. Los problemas respiratorios son característicos del edema pulmonar, síntoma habitualmente de envenenamiento grave por carbamato. Las empresas distribuidoras advierten que las personas con bajo nivel de colinesterasa basal o afecciones hepáticas pueden agravar su estado con la exposición a este plaguicida.¹⁹

Por otra parte, diversos estudios han aportado evidencia sobre la toxicidad del carbofurán en mamíferos de ensayo expuestos oralmente. También se ha verificado dicha toxicidad en la exposición humana. En un estudio de dos años de duración con ratas macho y hembra expuestas a este plaguicida a través de su dieta se pudo advertir la inhibición de colinesterasa en plasma, eritrocitos y cerebro.²⁰

b) Toxicidad crónica

Este agrotóxico no sólo afecta el sistema nervioso central, generando ansiedad, dolor de cabeza, irritabilidad y agresividad, sino también el sistema

inmunológico. En este caso, los síntomas evidentes son cansancio, falta de apetito y debilidad general. También puede provocar efectos teratogénicos, es decir, daños en el embrión o feto (abortos) y mutagénicos (cambios en el material genético, que pueden traducirse en malformaciones congénitas, abortos o cáncer, entre otras afecciones).²³

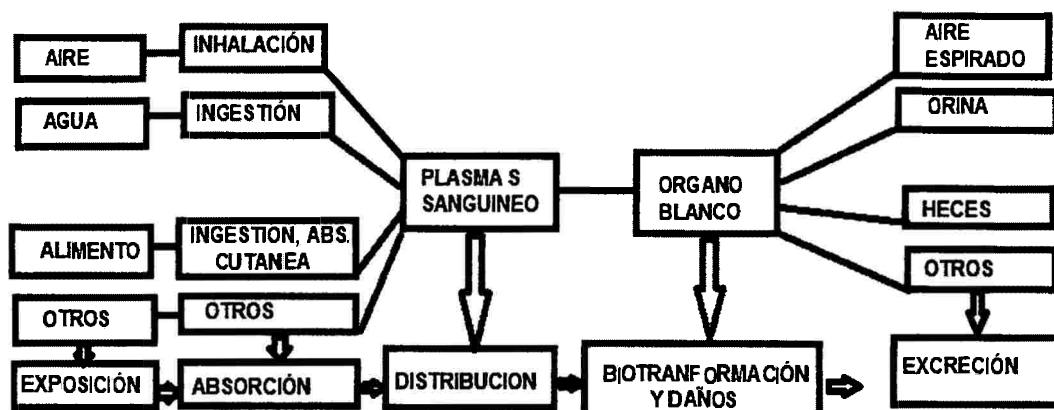


Figura 4. Dinámica de los plaguicidas en el organismo.¹⁶

2.3.6. Efectos en el medio ambiente de los plaguicidas

Los informes de las Naciones Unidas estiman que de todos los plaguicidas usados en la agricultura, menos del 5% alcanza los cultivos. El resto termina contaminando la tierra, el aire y principalmente el agua, existe un gran problema de acumulación de consecuencias no predecibles en un futuro de cercano.²⁴

El uso de diversas plaguicidas sin negar su contribución al incremento de la productividad agrícola a nivel mundial contribuye a la contaminación del ambiente, afectando principalmente cuerpos de agua debido al uso indiscriminado e inadecuado de ellos, generando un grave desequilibrio en los ecosistemas, así como un incremento de la dependencia tecnológica, reducción de controladores biológicos, resistencia en insectos plaga, deterioro de los suelos y aumento en los costos de producción, sobre todo en países en desarrollo.²⁵

Las empresas distribuidoras reconocen que el carbofurano es muy tóxico para peces, aves y abejas. Según la EPA,²⁶ el carbofurán presenta riesgos preocupantes para las especies acuáticas y aviares, pájaros, mamíferos e invertebrados, en todos los usos registrados del plaguicida.

Vecinos de la localidad de Punta Indio - Provincia de Buenos Aires, Argentina - están sustentando una demanda judicial contra productores de la zona a causa de la mortandad de aves asociada al uso del plaguicida carbofurano. El Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, informó que luego de finalizar una serie estudios y análisis de laboratorio que permitió ir descartando diversas hipótesis, había llegado a la conclusión que la muerte de las aves se debió a una intoxicación aguda de origen alimentario por carbamatos.²⁰



Figura 5. Fumigación aérea a gran escala de pesticidas.²⁶

En países europeos se ha producido a través de los años una gran mortandad de animales silvestres por esta causa. Incluso en la actualidad el carbofurán y otros carbamatos se siguen usando deliberada e ilegalmente como venenos contra predadores. En España, los productos tóxicos que fueron encontrados en el mayor número de casos de envenenamiento de animales silvestres el año 1999 fueron el aldicarb y el carbofurán. Este último siguió siendo detectado en los años posteriores en la mayoría de los cebos colocados en forma ilegal para

exterminar predadores. Las especies más afectadas en ese país han sido el *Aquila adalberti* "águila imperial", *Aegypius monachus* "buitre negro" y *Vulpes vulpes* "zorro". Las organizaciones ambientalistas solicitaron la adopción de medidas para frenar este problema.²³

2.3.7. Biodegradación de plaguicidas

Millones de toneladas de pesticidas son aplicadas anualmente; sin embargo, menos del 5% de estos productos son los que alcanzan el organismo blanco, el resto es depositado en el organismo del suelo así como en la atmósfera y el agua.¹ El fenómeno por el cual un pesticida que llega al suelo es degradado por microorganismos que se han adaptado a esas condiciones, consecuencia de su previa exposición al pesticida y/o composición química de similar estructura.²⁷ Es decir la biodegradación es el proceso por el cual los pesticidas aplicados al suelo son desdoblados por microorganismos del suelo en metabolitos no tóxicos para los seres vivos y para el medio ambiente. Aparentemente el primer proceso de degradación de las pesticidas es por hidrólisis ya sea químico, físico o microbiano. Dicha degradación es lo que previene la contaminación de los suelos y aguas subterráneas. Sin embargo, cuando el proceso es acelerado por la presencia de microorganismos adaptados por previas aplicaciones del mismo producto o similares, la descomposición del producto es tan rápida que su efecto residual se reduce drásticamente, perdiéndose su eficacia en el control.²⁸

Durante muchos años se creía que los mecanismos de degradación de los plaguicidas eran similares en animales, plantas y en microorganismos. Pero con el avance de las investigaciones se apreciaron las diferencias, en animales se da una conversión de éstos compuestos de forma que puedan ser excretables, éste proceso se da principalmente en el hígado. En plantas y microorganismos su

utilización es por el contrario una forma de obtención de energía o fuente de carbono, denominado como proceso metabólico.²⁸

2.3.8. Metabolismo de plaguicidas en plantas y microorganismos

El metabolismo de insecticidas es dependiente en condiciones ambientales abióticas (temperatura, humedad, suelo, pH, etc.), comunidad microbiana o especies plantas (o ambos), características insecticidas y reacciones biológicas y químicas. Degradación abiótica es debido a transformaciones del insecticida por procesos tal como fotólisis, hidrólisis, oxidación, reducción y cambios. Los futuros pesticidas pueden no estar disponibles porque la compartimentalización, como resultado de la absorción en suelo y coloides del suelo sin alterar la estructura química de la molécula original. Sin embargo, transformación enzimática, que es principalmente el resultado del proceso biótico mediado por plantas y microorganismos, es en gran medida la ruta principal de la desintoxicación. El metabolismo de los insecticidas puede implicar tres fases. En fase I metabolismo, las propiedades iniciales de un compuesto original son transformados a través de oxidación, reducción o hidrólisis a producir generalmente más soluble en agua y usualmente menos tóxico el producto que el original.²⁹

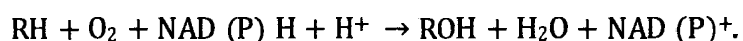
La segunda fase implica conjugación de un pesticida o metabolito del pesticida a un azúcar, aminoácido o glutatión, que incrementa la solubilidad en agua y reduce la toxicidad comparado con el pesticida original y puede ser almacenado en orgánulos celulares, generalmente ésta fase poca o no tóxica. Mientras la tercera fase implica conversión de los metabolitos de las fases II en conjugados secundarios, que son también no tóxicos y pueden formar parte de estructuras celulares y/o ser utilizadas como fuente de energía.²⁹

Tabla 5. Características y fases del metabolismo de insecticidas.²⁹

Características	Prop. inicial	Fase I	Fase II	Fase III
Reacciones	Compuesto inicial	Oxidación, reducción, hidrólisis	conjugación	Conjugación secundaria o incorporación en biopolímeros
Solubilidad	Lipofílicos	Ampofílico	Hidrofílico	Hidrofílico
Toxicidad	Tóxico	Modificado o no tóxico	En general no tóxico	No tóxico
Biodisponibilidad	***	***	**	*

a. Transformaciones oxidativas

Reacciones por citocromo P450. Oxigenación es el primer paso más frecuente en la biotransformación de pesticidas y otros xenobióticos orgánicos. Muchos de estas reacciones por enzimas oxidativas como ejemplo citocromo P450, peroxidasas y polifenol oxidasas. Más extensivamente estudiados son las enzimas oxidativas en plantas y animales son las P450s, que son las enzimas más importantes en Fase I en metabolismo de insecticidas.³⁰ Citocromo P450s con frecuencia cataliza reacciones monooxigenasas, usualmente resultando en hidroxilación, de acuerdo a la reacción siguiente:



Sin embargo, hay muchas otras reacciones mediadas por P450 incluyendo deshidratación, dimerización, desaminación, reducción y C-C o C=N. El biodegradación mediada por P450 del metabolismo de los pesticidas puede presentarse, mediante dos vías:

- Mutación de un P450 existente, permitiendo el atascamiento y el metabolismo creciente del pesticida.

- Aumentó actividad de P450.³⁰

Peroxidasas, fenoloxidasas y oxidoreductasas relacionada. Plantas y microorganismos producen un par de rangos de enzimas oxidasas (Peroxidasas, fenoloxidasas, lacasa y tirosinasa), por tanto el metabolismo pesticidas mediados por peroxidasas es similar a P450s, incluye descarboxilación, oxidación sulfuro, N-demetilación, hidroxilación del anillo y oxidaciones del grupo metilo aromático.³⁰

b. Transformaciones nitroaromáticos oxidativas

En microorganismos a comparación con las plantas, la diversidad de enzimas que presentan toman gran variedad de vías metabólicas que son capaces de oxidar compuestos nitroaromáticos y en muchos casos estas enzimas se han purificado, con tal de realizar la descripción de las reacciones oxidativas que transforman varios de estos compuestos nitroaromáticos.³¹ En bacterias, las enzimas monooxigenasas, flavin monooxigenasas y dioxigenasas son generalmente implicados en oxidaciones iniciales de pesticidas nitroaromáticos, ej. 2,4-dinitrofenol puede ser metabolizado por estas tres enzimas.³²

c. Transformaciones hidrolíticas

Las enzimas hidrolíticas enlazan iones H^+ u OH^- del H_2O al sustrato. Hay muchos enzimas hidrolíticas que son capaces de metabolizar una variedad de sustratos, particularmente las que contienen grupos funcionales amida, carbamate o ester. Estas enzimas pueden ser divididas en compartimentos o reacciones extracelulares y pueden ocurrir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Como la mayoría de las clases de enzimas, las enzimas hidrolíticas pueden tener amplios sustratos específicos, de tal modo permiten degradación de una variedad de pesticidas.¹

d. Transformaciones nitroreductivos aromáticos

Compuestos nitroaromáticos sufren transformaciones diferentes en plantas en comparación con microorganismos. Por ejemplo, metabolito de trifluralin en *Arachis hypogaea* "cacahuate" es N-depropylated trifluralin, mientras que en *Ipomoea batatas* "patata dulce" la monoamino derivado de trifluralin es predominante. En contraste las bacterias, trifluralin es transformada vía nitroreductasa.¹

Tabla 6. Actividad metabólica de plaguicidas en plantas y microorganismos.¹

Biotransformación	Planta	Microorganismo
Metabolismo general de Pesticidas	Detoxificación	Mineralización
Oxidación	Mediados por P-450	Mediados por varias oxidoreductasas y P-450
P-450 oxidación	Límite de membrana microsomal	Soluble de no límite de membrana
Transformación hidrolítica	Predominantemente vía esterases, amidasas, aril acilamidadasas y nitrilasas	Mayor diversidad de enzimas
Procesos aromaticos Nitroreductivos	Nitroreductasas	Nitroreductasas
Dehalogenación reductiva	GSHa Conjugación	No GSH conjugación
	No conocido	Halo-respiración

En bacterias, tres rutas de metabolismo reductivo de nitroaromáticos han sido caracterizadas; nitroreducción aromática, nitroreducción parcial e hidrogenación. El metabolismo reductor de xenobióticos nitroaromáticos es mediado por enzimas nitroreductasas encontrado en bacterias aeróbicas y anaeróbicas y varios géneros de hongos.¹

El metabolismo de algunos plaguicidas cloradas que se produce en ambientes anóxicas está ligada a la dechloración reductora, siendo el derivado sin cloro

mucho menos tóxico que la molécula original clorada, tales como las bacterias del género *Desulfomonile* que reduce 3-clorobenzoato a benzoato y Cl^- ; también se produce la dechloración aeróbica de compuestos orgánicos clorados probablemente por mecanismos bioquímicos diferentes a la degradación anaeróbica. Pero la dechloración reductora es de particular interés ambiental debido a la rapidez con la que pueden desarrollarse las condiciones anóxicas en hábitat natural contaminados por microorganismos.³³

2.3.9. Factores que afectan la biodegradación de los plaguicidas

La mayoría de los microorganismos necesitan de diferentes factores para su óptimo crecimiento, como se detallan:

a) **Nutrientes y oxígeno.** Para el desarrollo y supervivencia de los microorganismos, se hace necesario los nutrientes y el oxígeno para llevar a cabo procesos de biosíntesis y otras funciones celulares. Cada organismo necesita diferentes nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos para cada género, pero en todo los casos requiere de macronutrientes (carbono, nitrógeno y fósforo) que se necesitan en grandes cantidades, mientras que otros llamados micronutrientes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , S^{2-}), se proporcionan en menores cantidades y a veces solo en cantidades trazas. Los nutrientes se asimilan en estado elemental (orgánico e inorgánico), presentes en el ambiente y por lo tanto la cantidad presente de estos y el estado de los mismos son importantes para llevar a cabo un proceso de biodegradación.³³

b) **Humedad del suelo.** Los microorganismos al igual que todos los organismos, necesitan humedad para crecer, ya que se componen por más de un 80% de agua. Por lo tanto, es importante mantener el contenido de humedad a un nivel adecuado, que de acuerdo a varios autores, es de 50 a 80%.

c) **pH del suelo.** Afecta a los microorganismos y sus enzimas, influyendo tanto en la disolución y biodegradación de las diversas moléculas y en la disponibilidad de nutrientes.³⁴ La mayoría de las bacterias heterótrofas desarrollan óptimamente a valores de pH cercanos a la neutralidad dentro de un intervalo de 6,5 a 8,5.³⁵

d) **Temperatura.** Es un factor que afecta la supervivencia, el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos y así mismo influye en los cambios estructurales y químicos de la mayoría de los plaguicidas, la biodegradación de plaguicidas en suelos puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas, esta disminuye cuando la temperatura es menor de 20 °C, y aumenta en 30 °C.³⁶

Los microorganismos utilizan las pesticidas como fuente de carbono, energía y nutrientes. Dicho proceso es común en todos los cultivos donde se aplican diferentes pesticidas como *Solanum sp.* "papa". Dicho fenómeno se asocia no solo con los insecticidas y nematocidas como carbofurán, sino también con los herbicidas, fungicidas. En algunos casos microbios adaptados a degradar rápidamente un pesticida específico en un suelo, degradan también pesticidas relacionados químicamente en su composición y estructura. Es así como en el caso de los nematocidas carbamatos se dice que la biodegradación es cruzada. Es decir que microorganismos que degradan carbofurán también pueden degradar otros carbamatos. Esto significa que el nematocida carbamato oxamyl puede potencialmente ser degradado por los microorganismos que degradan el carbofurán y viceversa. En el caso de los organofosforados se indica que la biodegradación es específica. Es decir que los microorganismos que degradan un organofosforado no son capaces de degradar a otro del mismo grupo. Sin embargo, Anderson *et al.* citado por Marín³³ encontró bacterias que degradan fenamifos pueden degradar también otros organofosforados y bacterias que

degradan otros carbamatos y organofosforados, también pueden degradar fenamifos. Un ejemplo en los organofosforados es el caso de moléculas de similar estructura como el cadusafos que son degradados por los mismos microorganismos. Las vías metabólicas son muy variadas: fermentaciones, respiraciones anaeróbicas, acción de exoenzimas y quimiolitótrofos.³³

2.3.10. Géneros de bacterias degradadoras de los plaguicidas

La presencia de bacterias capaces de metabolizar los diferentes insecticidas ha recibido una especial atención, debido a que han sido el resultado de un proceso de evolución de poblaciones microbianas autóctonas que se han adaptado a estos contaminantes y porque proveen la posibilidad de ser usadas *in situ* en la detoxificación de ambiente severamente contaminados. Por esta razón, estos sitios son los más apropiados para el aislamiento de cepas capaces de crecer y en consecuencia de degradar estos xenobióticos.⁵

La bibliografía referente sobre biodegradación de pesticidas por microorganismos aislados del suelo, en otros países está bien documentada. Bacterias individuales como la *Pseudomonas spp.* y *Flavobacterium sp.* se relacionaron con la degradación de ciertos pesticidas. También se cita la degradación por efecto sinérgico de dos o más microorganismos como el *Arthrobacter sp.* con *Streptomyces sp.*³⁵

Read citado por Wang *et al.*³⁶ en 2007 encontró un *Penicillium* y las bacterias *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Achromobacter* y *Bacillus* degradando aldicarb. También cita a Karns *et al.* quienes encontraron que un *Achromobacter* aislado de suelo tratado con carbofuran, que también hidroliza a otro carbamato. Mientras en la biodegradación de organofosforados se incluye *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Streptomyces*.

Tabla 7. Géneros de microorganismos heterótrofos que usan plaguicidas.¹⁰

Bacterias	Actinomicetos	Hongos
Agrobacterium	Streptomyces	Alternaria
Arthrobacter	Nocardia	Aspergillus
Bacillus	Micromonospora	Cladosporium
Corynebacterium		Fusarium
Flavobacterium		Glomerella
Klebsiella		Mucor
Pseudomonas		Penicillium
Xantomonas		Rhizoctonia
Clostridium		Trichoderma
Achromobacter		

2.4. Marco legal

2.4.1. Normas de regulación internacionales de los plaguicidas

Es conveniente armonizar las normas de registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola a nivel internacional, teniendo en cuenta las condiciones de salud, agronómicas, sociales, económicas y ambientales de los diversos países, con base en los principios establecidos en el Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), y las directrices de los organismos internacionales competentes, que sean acordadas por los países miembros; que un sistema armonizado de registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola contribuye a mejorar las condiciones de su producción, comercialización, utilización y disposición final de desechos en los países miembros, elevando los niveles de calidad, de eficacia y de seguridad para la salud humana y el ambiente. Entre los objetivos enmarcados establecer requisitos y procedimientos armonizados para el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola, orientar su uso y manejo

correctos para prevenir y minimizar daños a la salud y el ambiente en las condiciones autorizadas, y facilitar su comercio en la subregión.

Diferentes países tienen diferentes regulaciones, requisitos y límites legales en relación a plaguicidas. Debido a esto, productos o plaguicidas en las vías de comercio pueden ser sujetos a reglamentaciones sobre plaguicidas tanto del país importador como del exportador.³⁹

Los organismos internacionales que toman la responsabilidad de regular las diversas pesticidas mediante sus normativas correspondientes son:

- Comisión del Codex Alimentarius.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO).
- Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), México.
- Tratado de Estocolmo.
- Decisión 436 de la Comunidad Andina.

2.4.2. Normas de regulación nacional de los plaguicidas

Actualmente el registro de plaguicidas químicos de uso agrícolas está regulado por la Decisión 436 de la Comunidad Andina, Norma Andina para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola, y su Manual Técnico aprobado por Resolución 630 de la Secretaría General de la Comunidad Andina, los cuales son complementados con el Reglamento para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola, aprobado por Decreto Supremo N° 16-2000-AG y sus normas modificatorias (Resolución Ministerial N° 476-2000-AG, Resolución Ministerial N° 639-2000-AG y Resolución Ministerial N° 1216-2001-

AG). Los productos biológicos formulados se siguen regulando por lo normado en el Decreto Supremo N° 15-95-AG, Reglamento sobre el Registro, Comercialización y Control de Plaguicidas Agrícolas y Sustancias Afines.³⁹

El proceso de registro implica una evaluación administrativa, como son el cumplimiento de los requisitos documentarios y formalidades de carácter legal, y otra técnica, realizada por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) para los aspectos agronómicos y especificaciones técnicas, la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) del Ministerio de Salud para los aspectos de toxicología humana e Instituto Nacional de Recursos Naturales (INRENA) en los aspectos ambientales.

Asimismo, los plaguicidas registrados están sujetos a procesos de re - evaluación de acuerdo al surgimiento de nueva información técnico - científica, sobre la eficacia, toxicidad o ecotoxicidad, que pueda implicar en algunos casos restricciones en su registro o en otros hasta su prohibición.³⁹

2.4.3. Plaguicidas agrícolas restringidos y prohibidos

La Organización de Mundial de la Salud y los órganos internacionales referidos al control y regulación de plaguicidas, así como también las autoridades nacionales, ha recogido la preocupación relacionada con el impacto negativo de los plaguicidas a nivel del agro y la salud de la población. A tal efecto logran definir el marco político-legal para iniciar el proceso de reducción de uso de los plaguicidas y sentar las bases de la agricultura sostenible, regulando los siguientes plaguicidas: Aldrin, Captafol, Endrin, Clorobencilato, Dieldrin, Hexacloro, benceno, BHC/HCH, Pentaclorofenol, Canfecloro/Toxafeno, Clordano, 2,4,5-T, Dibromuro de etileno, DDT, Clordimeform, Parathion etílico, compuestos de mercurio, Parathion metílico, Fosfamidon, Monocrotofos,

Lindano, Binapacril, Mirex, Dinoseb, Sales de dinoseb, Fluoroacetamida, Dinitro Orto Cresol (DNOC), Heptacloro, Óxido de etileno y Dicloruro de etileno.³⁹

Arsenicales: sólo para ser usados en el cultivo del algodón.

Aldicarb: sólo usos registrados.

Paraquat: agregando sustancia emética, color, olor.

Metamidofos: uso de disolventes etilenglicol y/o dietilenglicol, envases de COEX o polietileno de alta densidad e inclusión de un folleto de uso y manejo seguro.³⁹

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

Ubicación política	: Distrito de Chiara, Provincia de Huamanga, Región de Ayacucho (Anexo 1).
Ubicación geográfica	: 13° 25' latitud sur y 74° 16' longitud este, correspondiente a la sierra central del Perú
Temperatura Ambiental	: máxima 15,5 °C; mínima 3,5 °C y media 9,5 °C.
Zona de vida	: paramo húmedo-subalpino subtropical (ph-SAS).
Altitud	: 4 500 m.s.n.m.
Humedad relativa	: 45%.
pH del suelo	: 5,3.
Características	: suelos arcillosos limosos.

3.2. Muestra y sistema de muestreo

- La muestra fue representado por 18 unidades de muestra, cada uno conteniendo 1 Kg de tierra agrícola, tomadas de la parte central e inferior de los nueve terrenos del cultivo de *Solanum sp.* "papa" en post cosecha; tomadas por método no probabilístico o por conveniencia.
- Los criterios de inclusión para tomar las muestras fueron: zona de mayor producción de *Solanum sp.* "papa",^{38'39} ubicación geográfica de mayor uso de agroquímicos²⁷ y tierras de cultivo con historial de siembra de *Solanum sp.* "papa" mínimo dos años en periodo de post cosecha.

3.3. Métodos para la recolección de datos

3.3.1. Obtención de muestras

- Se demarcó un área de 100 cm² (10x10 cm) en la parte central y baja del terreno agrícola post cosecha, de donde se tomaron las muestras.
- Se retiró la capa superficial de tierra de unos 10 a 15 cm, con ayuda de una paleta desinfectadas.
- Se tomó aproximadamente 1000 g de suelo, entre los 10 y 20 cm de profundidad, luego se introdujo en una bolsa de polietileno nueva.
- Las muestras fueron trasladadas en "cooler" a una temperatura de 5 °C al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga para su posterior procesamiento.

3.3.2. Aislamiento de microorganismos degradadores de carbofurán

- Se tamizó la muestra anteriormente recolectada, con malla de 2 x 2 mm para separar las piedras y partículas grandes, en condiciones asépticas.
- Se recogió 100 g del producto homogenizado y tamizado, luego conservó en frasco estéril de boca ancha y tapa hermética en lugar fresco (4 - 10°C) para su posterior estudio fisicoquímico y microbiológico.
- Se pesó 10 g de suelo tamizado, en condiciones asépticas. Luego se realizó diluciones sucesivas hasta 10^{-2} con agua destilada estéril como diluyente.
- 1,0 ml de la última dilución se inoculó a los frascos conteniendo el medio Busnell Hass,⁴¹ con las características que muestra en el Anexo 6.

Tabla 8. Composición del ensayo de aislamiento de bacterias biodegradadoras de carbofurán de suelos agrícolas.

N°	Ensayo	UFC/ml	V. final
1	BH-C50-M	Medio mineral Busnell Hass + 50mg/l plaguicida + inóculo	100ml
2	BH-C40-M	Medio mineral Busnell Hass + 40mg/l plaguicida + inóculo	100ml
3	BH-C30-M	Medio mineral Busnell Hass + 30mg/l plaguicida + inóculo	100ml
4	BH-C20-M	Medio mineral Busnell Hass + 20mg/l plaguicida + inóculo	100ml
5	BH-C10-M	Medio mineral Busnell Hass + 10mg/l plaguicida + inóculo	100ml
6	BH-C5-M	Medio mineral Busnell Hass + 5mg/l plaguicida + inóculo	100ml
7	BH-C30	Medio mineral Busnell Hass + 30mg/l plaguicida	100ml
8	BH	Medio mineral Busnell Hass	100ml
9	BH-M	Medio mineral Busnell Hass + inóculo	100ml

- Se incubaron a 30 °C en constante agitación durante 15 días (Anexo 8).
- A los 15 días de incubación se realizó el recuento estándar en placa para cada uno de los frascos del ensayo.
- A partir de cada uno de los frascos se aisló en medio agar Busnell Hass (BH) enriquecido con 30 mg/l de carbofurán.

- Enseguida se incubó a 30 °C por cinco días.
- Luego las colonias que lograron desarrollar (Anexo 10), se repicó en medio agar nutritivo hasta su purificación para su posterior conservación en cepario.

3.3.3. Estandarización de la curva patrón para la determinación de carbofurán por método cromogénico de DAPSONA.

a) Preparación de la solución de carbofurán.

- Se preparó 100 ml de solución a diferentes concentraciones conocidas de carbofurán utilizando agua destilada, teniendo en cuenta las siguientes concentraciones: 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1, mg/l de carbofurán.
- Enseguida se tomó 2 ml de la solución y se transfirió en un tubo de ensayo de 18 mm x 150 mm.
- Se prosiguió a combinar con 1 ml metanol absoluto, luego con 50 μ l de hidróxido de sodio 2 M.

b) Preparación de la solución de DAPSONA.

- Se pesó 0,2 mg de 4,4-diaminodifenilsulfona (DAPSONA), luego se disolvió en 5 ml de ácido clorhídrico 1 M.
- Enseguida se llevó a 100 ml con agua destilada, después se agregó 1 ml de nitrato de sodio 1%.
- Finalmente se encubaron a 5°C por tres minutos en constante agitación.

c) Reacción cromogénica de carbofurán.

- En tubo de ensayo de 18 mm x 150 mm se agregó 1 ml de la solución DAPSONA, luego se adicionó 2 ml de la solución de carbofurán anteriormente preparados.

- Enseguida se homogenizó hasta que tomar una coloración anaranjada (Solucion cromogénica).
- Luego se prosiguió a realizar lectura a 480 nm con el Espectrofotómetros UV-Visible Thermo Scientific serie GENESYS 10, previamente usando como blanco agua destilada.
- Con los valores obtenidos se prosiguió a determinar la curva de patrón estandarizada (Anexo 12).

3.3.4. Evaluación de la capacidad biodegradadora de carbofurán.

a) Preparación del inóculo.

- Se reactivó las cepas microbianos conformantes del consorcio en 10 ml de caldo nutritivo a 30 °C durante 48 horas. Luego se mezcló en matraz en condiciones asépticas.
- Enseguida se determinó la carga microbiana mediante el recuento estándar en placa.
- A continuación, al mismo tiempo se tomó 1,0 ml del inóculo y se trasplantó a cada uno de los frascos con 100 ml de Caldo BH enriquecido con: 10, 20, 30, 40, 50, 60, mg/l de carbofurán respectivamente con tres repeticiones (ensayo problema)
- Luego se preparó otros frascos con 100 ml de caldo BH enriquecido con: 10, 20, 30, 40, 50, 60, mg/l de carbofurán a los cuales no se trasplantaron el inóculo (ensayo blanco) y por último un fresco con 100 ml de caldo mineral Busnell Hass.
- Enseguida se incubaron a 30°C en constante agitación durante 30 días en un ambiente fuera del alcance de luz.

- A partir del día cero, cada 5 días durante 30 días, se determinó la concentración de carbofurán en cada uno de los frascos del ensayo.

b) Determinación de la capacidad biodegradadora de carbofurán.

- A partir de cada uno de los frascos en incubación, se tomó 2 ml de muestra debidamente homogenizados, Luego transfirió en tubo de ensayo de 18 mm x 150 mm en condiciones estrictamente asépticas.
- Se combinó con 1 ml metanol absoluto, luego se agregó 50 μ l de hidróxido de sodio 2 M y se homogenizó (solución de carbofurán problema).
- Se tomó 2 ml de la solución de carbofurán problema y se transfirió en otro tubo de ensayo 18 mm x 150 mm. Luego se adicionó 1 ml de la solución DAPSONA.
- Enseguida se homogenizó hasta que tome una coloración anaranjada.
- Luego se realizó la lectura a 480 nm con el Espectrofotómetros UV-Visible Thermo Scientific serie GENESYS 10, previamente usando como blanco al Medio Busnell Hass sin carbofurán y sin inóculo.
- Con los valores de la lectura se determinó la cantidad de carbofurán, de acuerdo a la ecuación y gráfico de la curva patrón estandarizado.

3.3.5. Identificación de cepas degradadoras de carbofurán.

- a) Caracterización cultural.** A los microorganismos (bacterias) aislados se ha caracterizado y diferenciado según las características culturales de cada una de las colonias.

b) Caracterización microscópica. La caracterización microscópica se hizo juntamente con la descripción macroscópica o cultural durante la purificación e identificación de cada uno de las cepas bacterianas aisladas. Finalmente agrupando en Gram positivo y negativo; como en coco y bacilo.

c) Caracterización bioquímica. Las cepas bacterianas aisladas luego de la diferenciación cultural y microscópica se realizaron la identificación bioquímica, para lo cual se realizaron las siguientes pruebas: fermentación de lactosa, oxidasa, catalasa, TSI, LIA, citrato, indol, coagulasa, hidrolisis de urea, hemolisis, motilidad, hidrolisis de gelatina, reducción de nitrato, crecimiento en anaerobiosis, presencia y ausencia de endospora, fermentación de manitol, sensibilidad al Na^+ , producción de CO_2 , producción de SH_2 .

3.4. Análisis de datos.

Con los datos obtenidos en los procedimientos anteriores se realizó análisis de estadística descriptiva para presentar los datos en forma de tablas, curvas e histogramas. Luego se realizó análisis de estadística inferencial como fue análisis de varianza con 95% de confianza, utilizando software SPSS Statistics 20 y Excel 2010.

IV. RESULTADOS

Tabla 9. Valores del recuento de carga bacteriana en ensayos de aislamiento de las bacterias biodegradadoras de carbofurán.

N°	Ensayo	UFC/ml
1	BH-C50-M	6,2*10 ⁶ UFC/ml
2	BH-C40-M	8,5*10 ⁶ UFC/ml
3	BH-C30-M	8,6*10 ⁶ UFC/ml
4	BH-C20-M	8,5*10 ⁶ UFC/ml
5	BH-C10-M	8,4*10 ⁶ UFC/ml
6	BH-C5-M	8,4*10 ⁶ UFC/ml
7	BH-C30	0 UFC/ml
8	BH	0 UFC/ml
9	BH-M	3 UFC/ml

NOTA: Los valores mostrados son el resultado del recuento estándar en placa, a los 15 días de incubación del medio líquido. BH: medio Busnell Hass, C: concentración de carbofuran en mg/l, M: muestra de suelo.

Tabla 10. Características culturales y test Gram de cepas bacterianas con capacidad biodegradadora de carbofurán.

Clave	Características culturales	
	Forma	Gram
CPB01	Colonias grandes de bordes irregulares plana y estrellado, color blanco, consistencia blanda	Bacilos +
CPB02	Colonias mediana, brillantes con consistencia cremosa, bordes regulares de color blanco.	Bacilos -
CPB03	Colonias pequeñas, brillantes con consistencia cremosa, bordes regulares de color gris	Bacilos -
CPB04	colonias medianas, cremosa con bordes regulares, con elevación mediana de color blanca	Coco +
CPB05	Colonias medianas, brillantes de color gris, circular, bordes irregulares de consistencia cremosa	Bacilos -
CPB06	Colonias grandes, convexas, blanquecinas o translúcidas, forma circular, bordes redondeados	Bacilos -
CPB07	Colonias grandes de color grisáceas de aspecto granuloso, traslúcidas, de bordes regulares.	Bacilos +
CPB08	colonias medianas, cremosa con bordes regulares, planas de color gris	Bacilos -
CPB09	Colonias pequeñas, brillantes de color amarillo, forma circular de consistencia cremosa	Bacilos -
CPB10	Colonias medianas de bordes regulares plana de color blanco gris y una Consistencia blanda	Bacilos -
CPB11	Colonias pequeñas brillantes de bordes regulares plana de color gris y una Consistencia blanda	Bacilos -
CPB12	Colonias medianas de bordes regulares plana de color blanco y una Consistencia blanda	Bacilos -
CPB13	Colonias medianas de color amarillentas , con bordes regulares de consistencia cremosa	Coco +
CPB14	Colonias planas, de borde Irregular, con centro rosado y un tono más pálido alrededor	Bacilos -
CPB15	Colonias medianas de borde entero con elevación convexa, blanco, de consistencia cremosa	Bacilos -
CPB16	Colonias medianas, brillantes de color gris, bordes circular de consistencia cremosa	Bacilos -
CPB17	Colonias pequeñas de color grisáceas de aspecto granuloso, traslúcidas, de bordes regulares.	Bacilos -
CPB18	Colonias de tamaño mediano con elevación media blanco gris y cremosa con bordes irregulares	Bacilos -

Tabla 11. Identificación de bacterias degradadoras de carbofurán aisladas de suelos agrícolas.

Clave	Forma	Gram	Lact.	Gxid.	Catal.	Coag.	Hemol.	Urea	Mot.	Indol	TSI	TSI (CO ₂)	TSI (HS ₂)	LIA	Citr.	Gelat.	Nitr.	Género
CPB1	Bacilos	+	-	-	+	-	Gama	+	+	-	K/A	-	-	K/k	-	+	-	Bacillus
CPB2	Bacilos	-	+	-	+	-	Gama	+	-	-	A/A	-	-	K/k	+	-	+	Klebsiella
CPB3	Bacilos	-	+	-	+	-	Gama	+	-	-	A/A	-	-	K/k	+	-	+	Klebsiella
CPB4	Coco	+	-	+	+	-	Gama	+	-	-	K/k	-	-	K/k	-	+	+	Arthrobacter
CPB5	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	-	+	-	K/k	-	-	K/k	+	-	-	Serratia
CPB6	Bacilos	-	-	-	+	+	Gama	+	+	-	K/A	-	+	K/A	+	-	+	Proteus
CPB7	Bacilos	+	-	-	-	-	Beta	+	+	-	K/k	-	-	K/k	-	-	-	Corynebacterium
CPB8	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	+	-	-	K/k	-	-	K/k	+	+	+	Flavobacterium
CPB9	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	-	+	-	K/k	-	-	K/k	+	+	-	Serratia
CPB10	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	-	-	-	K/k	-	-	K/k	+	-	+	No identific.
CPB11	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	-	-	-	K/k	-	-	K/k	+	-	+	No identific.
CPB12	Bacilos	-	+	-	+	-	Gama	+	-	-	A/A	-	-	K/k	+	-	+	Klebsiella
CPB13	Coco	+	-	-	+	-	Gama	-	-	-	K/k	-	-	K/k	-	+	-	Micrococcus
CPB14	Bacilos	-	-	+	+	-	Gama	-	-	-	K/k	-	-	K/k	+	-	+	Aeromonas
CPB15	Bacilos	-	-	+	+	+	Gama	-	+	-	K/A	-	-	K/k	-	-	+	Pseudomonas
CPB16	Bacilos	-	+	+	+	-	Gama	-	+	-	A/A	-	-	K/k	+	-	+	Serratia
CPB17	Bacilos	-	-	-	+	+	Beta	+	+	-	K/k	-	-	K/k	-	-	-	Corynebacterium
CPB18	Bacilos	-	+	-	+	-	Gama	-	+	+	K/A	-	-	K/k	+	-	+	Citrobacter

Tabla 12. Estandarización de la curva patrón para la cuantificación de carbofurán.

N°	[] carbofurán en mg/l	Abs. obtenida	Abs. corregida	Ecuación obtenida
1	1 mg/l	0,04	0,03	
2	2 mg/l	0,12	0,08	
3	5 mg/l	0,23	0,23	
4	10 mg/l	0,48	0,48	
5	15 mg/l	0,72	0,73	
6	20 mg/l	0,91	0,98	
7	25 mg/l	1,14	1,22	
8	30 mg/l	1,37	1,47	
9	35 mg/l	1,68	1,72	
10	40 mg/l	2,12	1,97	
11	45 mg/l	2,32	2,22	
12	50 mg/l	2,61	2,47	
13	60 mg/l	2,92	2,96	
14	70 mg/l	3,40	3,46	
15	80 mg/l	3,80	3,96	
16	90 mg/l	4,62	4,45	
17	100 mg/l	4,89	4,95	
				Ecuación obtenida
				$Y = 0,05 X + 0,18$
				$R^2 = 0,99$
				Ecuación corregida
				$Y = 0,05 X + 0,018$
				$R^2 = 1$

NOTA: Los valores de estandarización de la curva patrón fueron realizados con la técnica cromogénico de DAPSONA.⁵¹

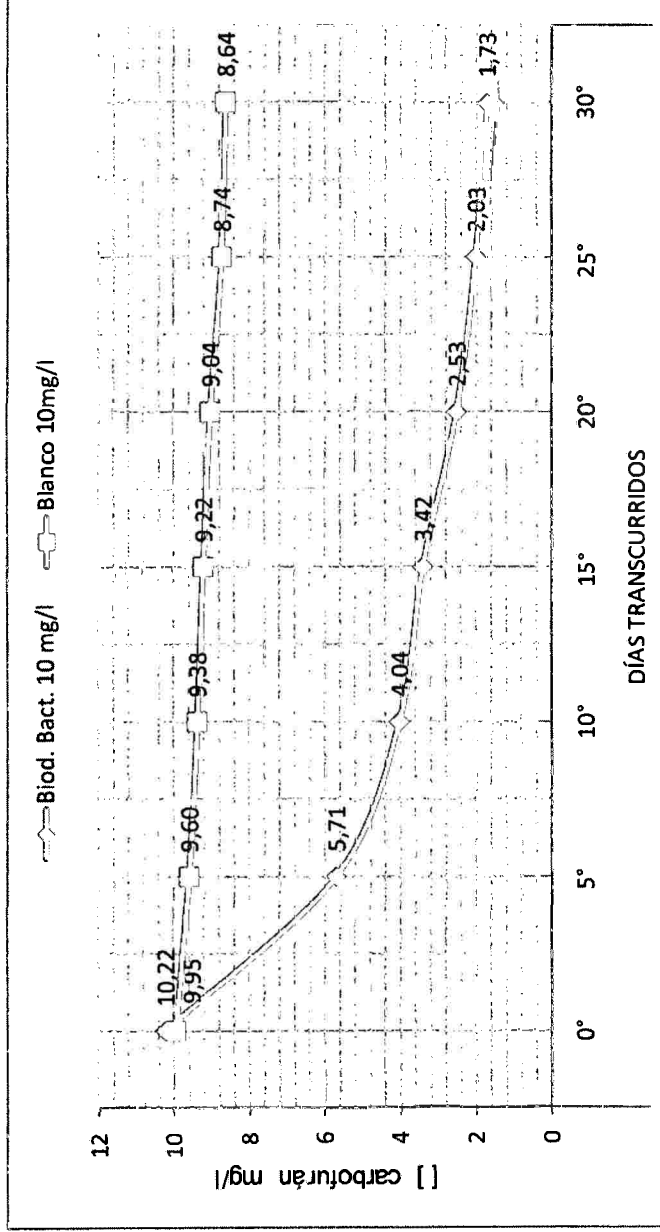


Figura 6. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 10 mg/l según días transcurridos.

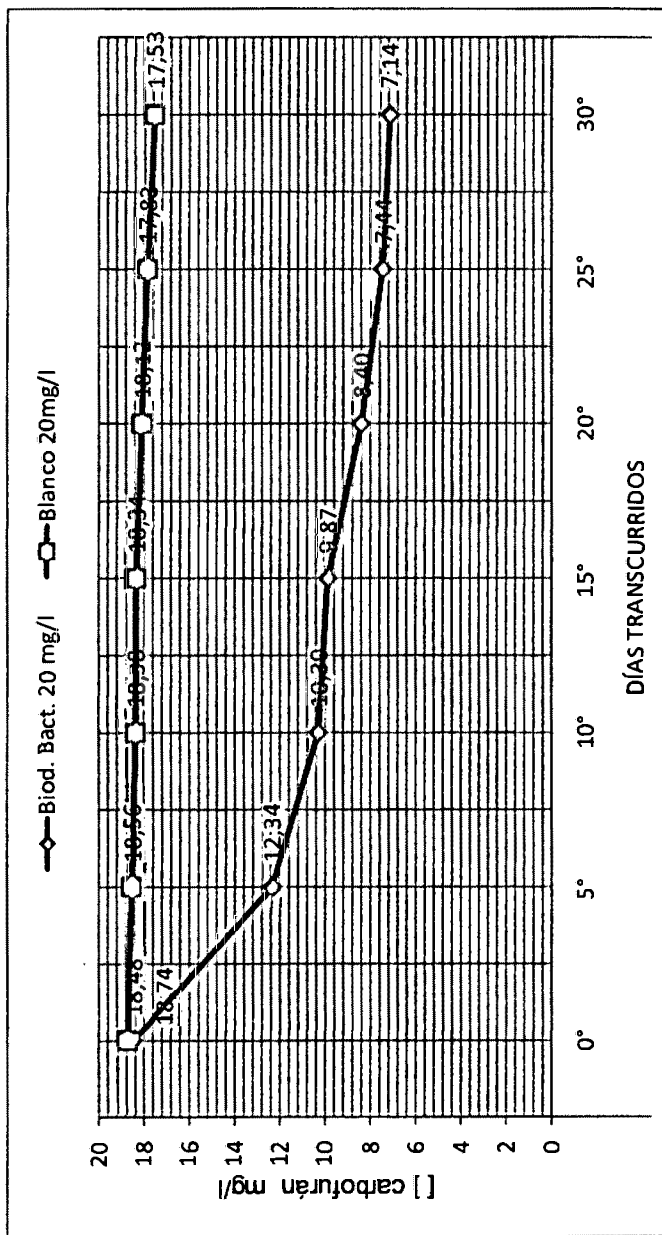


Figura 7. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 20 mg/l según días transcurridos.

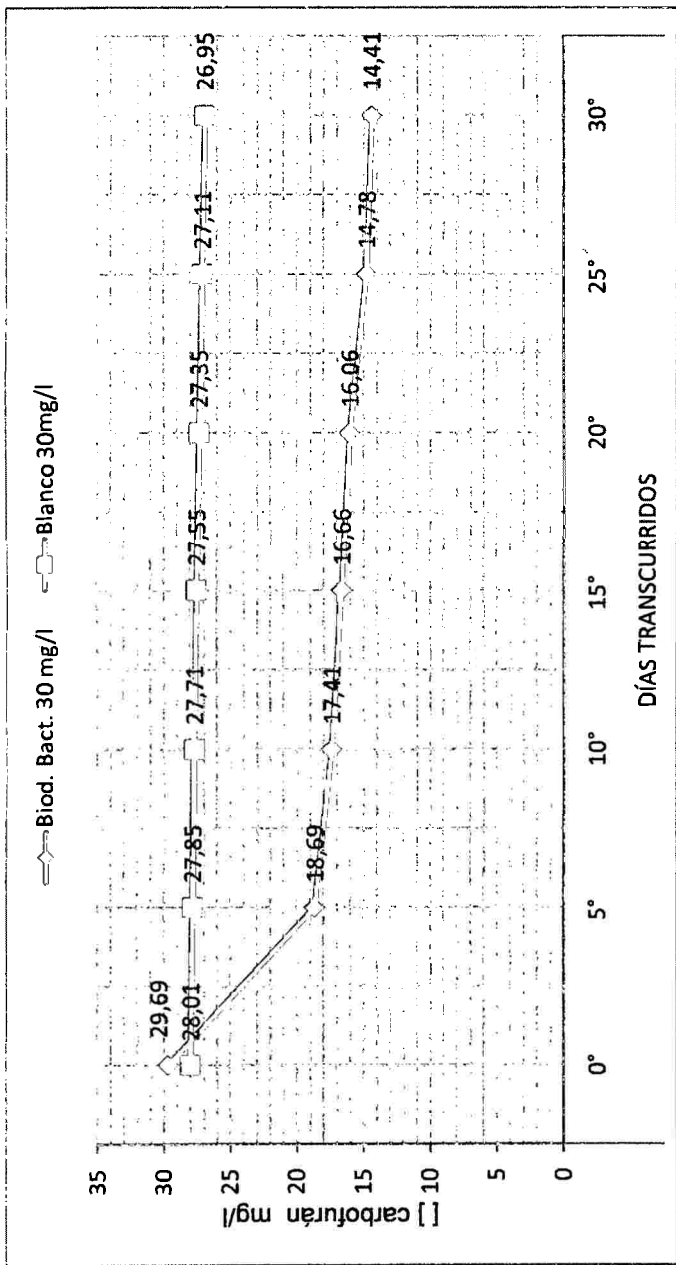


Figura 8. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 30 mg/l según días transcurridos.

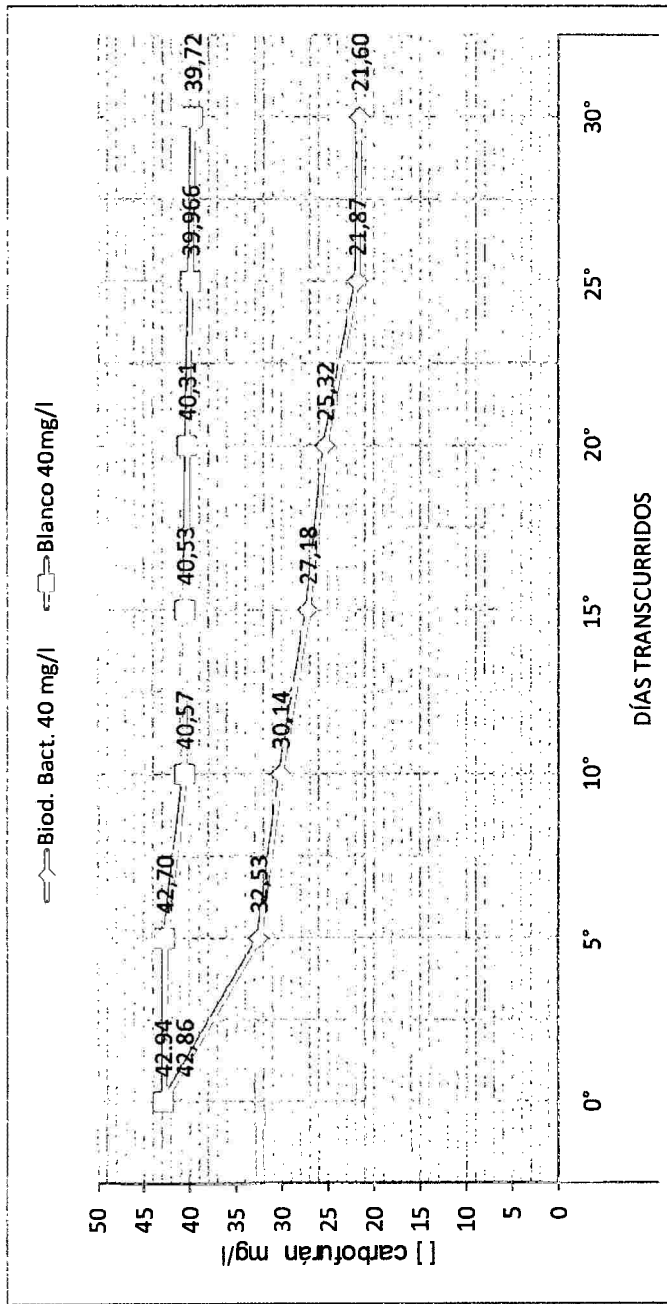


Figura 9. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 40 mg/l según días transcurridos.

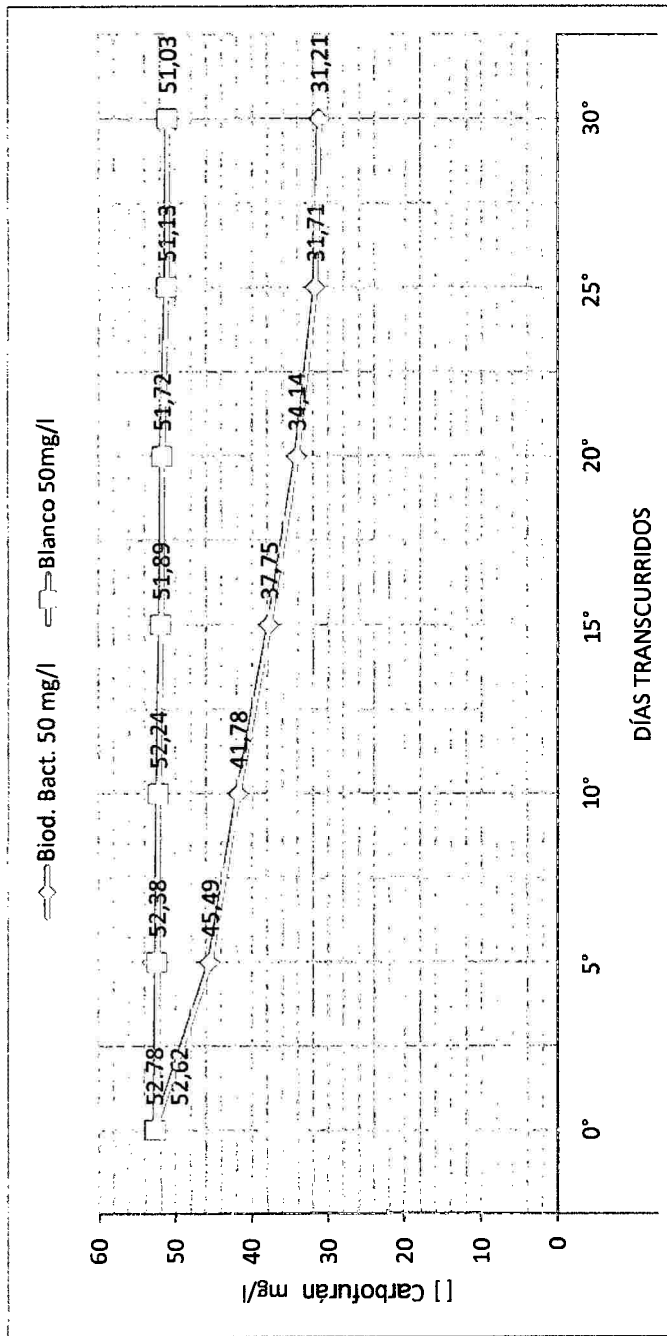


Figura 10. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 50 mg/l según días transcurridos.

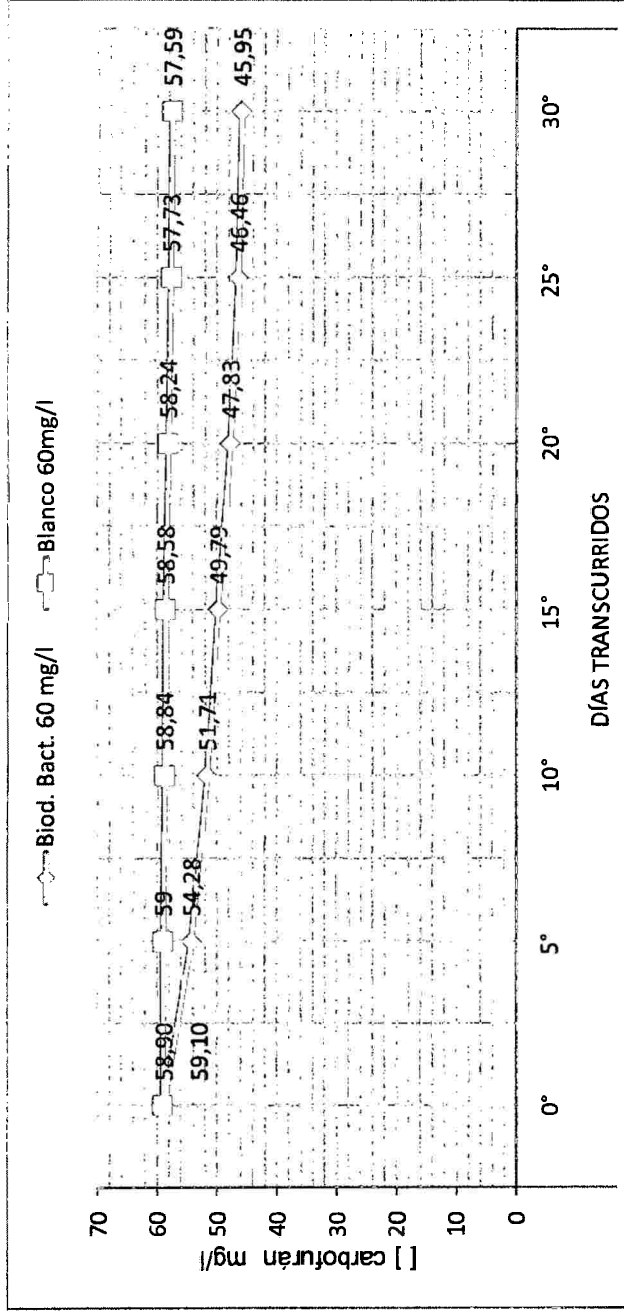


Figura 11. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 60 mg/l según días transcurridos.

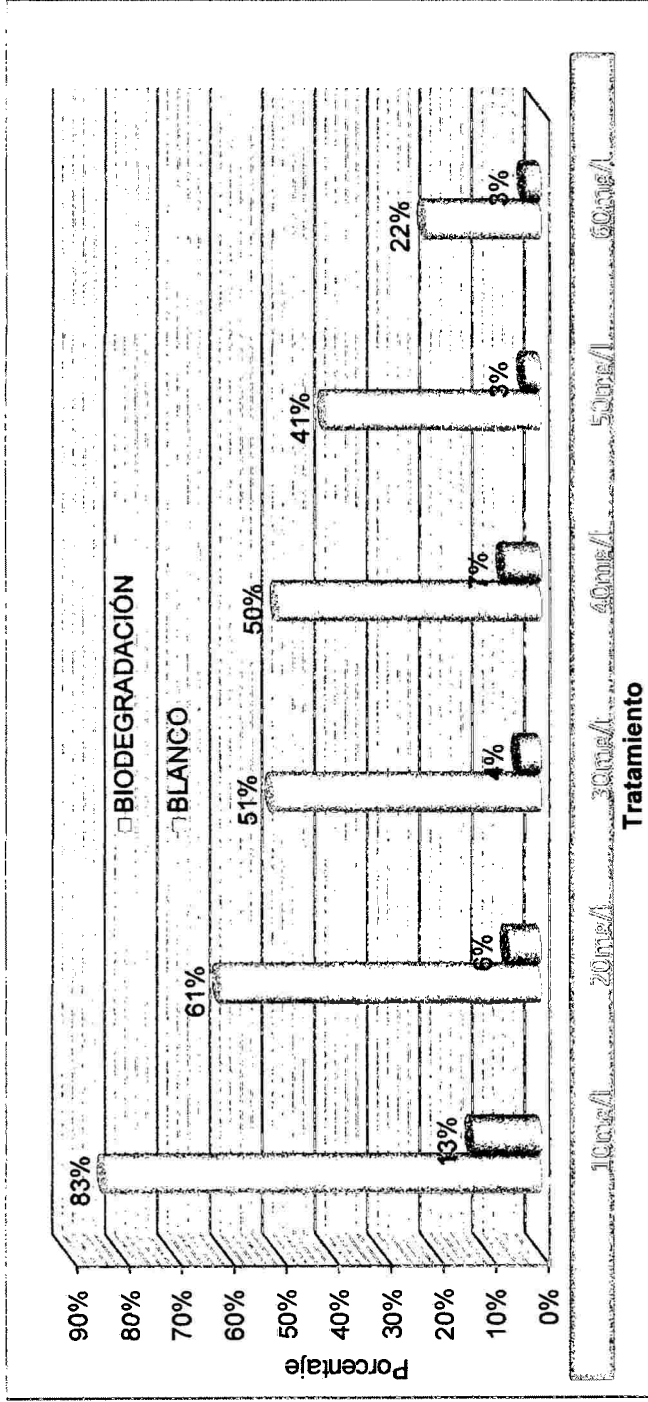


Figura 12. Porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano en relación a diferentes tratamientos.

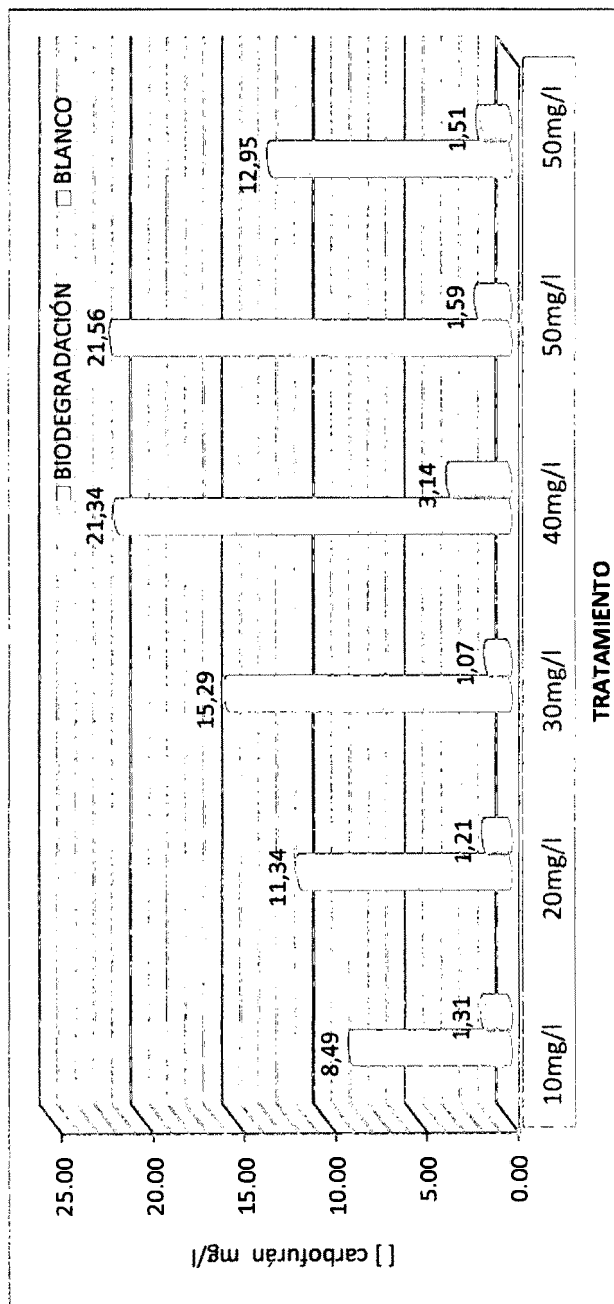


Figura 13. Cantidad total de carbofurán degradado en relación a diferentes tratamientos.

V. DISCUSIÓN

Ortiz-Hernández *et al.*⁵ en el año 2001 sugieren la conveniencia de buscar microorganismos degradadores de xenobióticos en sitios previamente expuestos a estos compuestos de interés para tener mayor probabilidad de éxito en los aislamientos, acorde a estas referencias, los puntos de muestreo para el presente trabajo tuvo lugar en las localidad de Chiara, donde la actividad agrícola, principalmente el cultivo de *Solanum sp.* "papa", es alto en relación a otras actividades.^{38,39} Pero también el desarrollo de estas actividades involucra el uso indispensable de diversos agroquímicos, principalmente los insecticidas (Furadán®) para el control de las diferentes plagas como es el *Premnotrypes sp.* "Gorgojo de los andes", que afecta durante la producción y almacenamiento de semillas de *Solanum sp.* "papa".²⁷ Por otra parte, la utilización constante de estas pesticidas en la producción agraria, hace que existan residuos de estas sustancias en tierras de cultivo, y entre en interacción con factores abióticos y bióticos (microorganismos) y luego sean degradados.

Aun cuando carbofurán es extremadamente tóxico y difícil de degradar, la exposición prolongada de microorganismos a éste provoca que se genere una presión selectiva que permite generar bacterias con capacidad biodegradadora;

adaptando hacia el desarrollo de enzimas capaces de actuar sobre este insecticida.⁴² Para tal efecto se ha planteado un ensayo de aislamiento de bacterias degradadoras de carbofurán a partir del suelo agrícola de la localidad de Chiara, teniendo como base el diseño planteado por Mendoza *et al.*⁴³ en 2011 y Castrejón *et al.*⁷ en el año 2009, tal como se muestra en la Tabla 8, donde la composición y condiciones del cultivo esta en relación a las concentraciones de carbofurán en cada uno de los ensayos del aislamiento, de tal forma que el aislamiento sea solo de bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán.

En la Tabla 9 se muestra los valores del recuento de carga microbiana en los ensayos del aislamiento de bacterias capaces en desarrollar en medio Busnell Hass enriquecidos con carbofurán, realizados mediante la técnica de recuento estándar en placa a los 15 días de incubación, y a los 24 horas antes de proceder con el aislamiento en medio sólido (agar Busnell Hass enriquecido con carbofurán). Los detalles de los valores obtenidos nos permiten tener referencia sobre la concentración de carbofurán con la que se debe trabajar en los aislamientos en el medio sólido, de tal forma que no exista la inhibición por sustrato (carbofurán) ni mucho menos déficit en nutrientes durante el periodo de incubación; donde los valores de los ensayos BH-C5-M, BH-C10-M, BH-C20-M, BH-C30-M y BH-C40-M resultaron $6,2 \times 10^6$ UFC/ml, $8,5 \times 10^6$ UFC/ml, $8,6 \times 10^6$ UFC/ml, $8,5 \times 10^6$ UFC/ml y $8,4 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente, los cuales son mayores en relación al valor del ensayo BH-C50-M que resultó $8,4 \times 10^6$ UFC/ml; esto muestra que la concentración de carbofurán influye en el desarrollo de las bacterias. Por lo tanto, teniendo en cuenta la toxicidad de carbofurán,¹⁹ requerimientos nutricionales de las bacterias⁴⁴ y el tiempo de incubación para el aislamiento en medio sólido; los ensayos BH-C20-M, BH-C30-M y BH-C30-M correspondientes a 20, 30 y 40 mg/l de carbofurán en caldo Busnell Hass,

pertenecen al rango de concentración óptima de carbofurán para aislamiento, por lo que se eligió utilizar 30 mg/l de carbofurán para enriquecimiento al medio agar Busnell Hass. Mientras los valores de los ensayos BH-C30 y BH (banco negativo) fueron nulos. Pero el valor del ensayo BH-M nuestra 3 UFC/ml, lo cual refleja la presencia de bacterias esporuladas en tierra agrícola⁴⁴ que permanece en este estado durante la incubación del ensayo por razones de falta de nutrientes (fuente de carbono) hasta el momento en que el medio es óptimo para su desarrollo vegetativo que ocurre al momento de siembra en agar nutritivo.

Los resultados antes indicados nos hace suponer que el aislamiento directo en agar nutritivo permite el crecimiento tanto de bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán como las bacterias esporuladas que no tienen la capacidad biodegradadora de carbofurán. De ahí la importancia del uso de agar Busnell Hass enriquecido con 30 mg/l de carbofurán, teniendo referencia a la mayor carga microbiana del recuento estándar en placa en la Tabla 9; de tal forma que las bacterias que logren desarrollar en este medio sean efectivamente lo que presenta la capacidad para degradar carbofurán, como se muestra en el Anexo 10. Luego agrupadas según las características culturales y microscópicas (Tabla 10).

El ensayo de biodegradación en el laboratorio se realizó utilizando el consorcio bacteriano aislados de suelos agrícolas de Chiara, a la vez teniendo en cuenta la influencia de las concentraciones de carbofurán sobre la actividad biodegradadora del consorcio. En la Figura 6 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en relación al tiempo a 10 mg/l de carbofurán. Luego a medida que pasa el tiempo los valores de carbofurán en el ensayo problema iniciaron reducir hasta 1,73 mg/l de carbofurán al final del ensayo. Mientras en el ensayo blanco la reducción es

mínima que llega hasta 8,64 mg/l de carbofurán. Esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 8,49 mg/l de carbofurán que equivale a 83% respecto a la concentración inicial.

En la Figura 7 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 20 mg/l de carbofurán. Luego a medida que pasa el tiempo lo valores del ensayo problema es reducido como producto de la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano, obteniendo al final del ensayo 7,13 mg/l de carbofurán mientras en el ensayo blanco 17,53 mg/l de carbofurán. Por tanto la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 11,34 mg/l de carbofurán que equivale a 61% respecto a la concentración inicial.

En la Figura 8 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 30 mg/l de carbofurán. Obteniendo al final del ensayo 14,41 mg/l de carbofurán, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 15,29 mg/l de carbofurán que equivale a 51% respecto a la concentración inicial. Mientras en el ensayo blanco 26,95 mg/l de carbofurán.

En la Figura 9 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 40 mg/l de carbofurán. Logrando reducir a los 30 días hasta 21,60 mg/l y 39,72 mg/l de carbofurán, tanto en el ensayo problema como en el ensayo blanco respectivamente. Por tanto la actividad biodegradadora del consorcio ha logrado reducir en 21,34 mg/l de carbofurán equivalentes a 50% respecto a la concentración inicial.

En la Figura 10 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 50 mg/l de carbofurán. Luego a medida que pasó el tiempo lo valores del ensayo problema es reducido, obteniendo al final del ensayo 31,21 mg/l de carbofurán. Esto significa que la

actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 21,56 mg/l de carbofurán que equivale a 41% respecto a la concentración inicial. Mientras en el ensayo blanco se redujo hasta 51,03 mg/l de carbofurán.

En la Figura 11 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 60 mg/l de carbofurán, logrando reducir a los 30 días hasta 45,95 mg/l y 57,52 mg/l de carbofurán, tanto en el ensayo problema como en el ensayo blanco respectivamente. Significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 12,95 mg/l de carbofurán que equivale a 22% respecto a la concentración inicial.

Tal como se muestra los resultados en la Figura 6 hasta la Figura 11; en los ensayos blanco negativo hay una cierta disminución de los valores de carbofurán respecto a la concentración inicial, lo que significa que la degradación no es exclusiva por fenómenos bióticos. Jones y Norris²⁹ plantean que el primer proceso de degradación del carbofurán es por hidrólisis ya sea química, física o microbiano. Ajona y Vidal⁴⁵ también describen que la degradación fisicoquímica dado por el proceso fotocatalisis solar y la volatilización son las principales vías de degradación del carbofurán. Mientras Stoorvogel *et al.*⁴⁶ en el año 2003 hacen la referencia sobre los procesos químicos de óxido-reducción de plaguicidas en el medio ambiente. En base a estas referencias planteamos que la causa de la reducción de carbofurán en los ensayos blancos, se debe a procesos abióticos. Teniendo como base a estas referencias el ensayo se realizó en un ambiente fuera del alcance de la luz solar y artificial como se ve en el Anexo 09 de tal forma que la desintegración fotocatalítica es inhibida.

Con respecto a los cuadros anteriormente señalados de biodegradación, la reducción significativa de los niveles de carbofurán ocurrió en los diez primeros días de incubación, luego se hace menos notorio. López⁴⁷ sostiene que los procesos bioquímicos son dependientes de la concentración de xenobióticos.

Carrillo *et al.*⁹ en 2004 sostienen que el valor de biodegradación son significativos cuando el consorcio bacteriano aisladas de una zona de constante aplicación del mismo producto o similares. Mientras en la Figura 11 (tratamiento con 60 mg/l de carbofurán) no ha mostrado una actividad biodegradadora significativa como tal en los tratamientos de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l, lo que significa que debe tener un gran cuidado con los microorganismos usados en altas concentraciones de pesticidas, ya que pueden ser inhibidos o causar su muerte por los efectos tóxicos de estos contaminantes.⁴

La Figura 6 muestra los valores de biodegradación en mg/l en relación a las diferentes concentraciones de carbofurán, hace notorio la variación de la actividad biodegradadora dada a diferentes concentraciones de carbofurán. Lo cual ha sido contrastada al realizar análisis de varianza con los datos obtenidos en cada uno de los tratamientos (nivel de confianza al 95%) como muestra en el Anexo 19. En los tratamientos con 30, 40 y 50 mg/l son los que mayor degradación se ha obtenido, es decir, el consorcio bacteriano presentes en dichos son los mayores responsables en la biodegradación de carbofurán durante los 30 días del ensayo, lo que no ocurrió en los tratamientos con 10 y 30 mg/l que por la baja dosificación de carbofurán hace que no haya interacción microorganismos sustrato que conlleva no activación de enzimas degradadoras. Mientras en el tratamiento 60 mg/l de carbofurán la actividad tóxica de esta insecticida no permitió un adecuado biodegradación.

Por tanto la biodegradación del carbofurán también depende múltiples factores como: condiciones ambientales abióticas (temperatura, humedad, pH, nutrientes, etc.), comunidad microbiana (especie y la relación entre ellos), características insecticidas (tipo y concentración) y reacciones biológicas y fisicoquímicas tal como reportan Ortiz-Hernández *et al.*⁵ Teniendo consideración estos factores

durante el ensayo de biodegradación, la temperatura fue acondicionada a 30 °C, el pH semejante a sitios de muestreo que fue cinco, ligeramente ácido (pH=5,5) y las concentraciones de variante de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/l de carbofurán.

Waliszewski *et al.*³⁰ describen que la esencia de biodegradación del carbofurán está dada por transformación enzimática, que es principalmente el resultado del proceso biótico mediado por microorganismos (bacterias). El metabolismo de los insecticidas (carbofurán) puede implicar tres fases. En fase I, las propiedades iniciales del carbofurán son transformados a través de oxidación, reducción o hidrólisis a metabolitos primarios, generalmente más soluble en agua y usualmente menos tóxico que el producto original. Seo *et al.*⁴⁸ reportan los metabolitos de carbofurán producto de biodegradación tales como: fenol del carbofurán, 3-ketocarbofurán, y 3-Hydroxycarbofurán. Así como también Chaudhry *et al.*⁴⁹ en 2002 reportaron los metabolitos del carbofurán producto de degradación microbiana: 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-hidroxibenzofurán, 3-hidroxicarbofurán, 3-hidroxicarbofurán-7-fenol, 3-ketocarbofurán y 3-ketocarbofurán-7-fenol.

La segunda fase implica conjugación a un azúcar, aminoácido o glutatión, que incrementa la solubilidad en agua y reduce la toxicidad comparado con el pesticida original. Generalmente, esta fase poco o no tóxico y puede ser almacenado en orgánulos celulares. Mientras la tercera fase implica conversión de metabolitos de la fase II en conjugados secundaria que son también no tóxicos; ciertamente este trabajo es un trabajo en grupo del consorcio bacteriano, que en algunas veces exista la participación de ciertas plantas.³⁰

Luego del ensayo de biodegradación realizados en laboratorio y logrado la recuperación del consorcio bacteriano con capacidad biodegradadora utilizando

agar Busnell Hass enriquecido con 30 mg/l de carbofurán y agar nutritivos como medio de purificación; se obtuvieron 18 cepas puras de acuerdo a las características culturales y coloración Gram como muestra en la Tabla 10. Luego teniendo en cuenta las características culturales y microscópicas prosiguieron a identificar mediante las pruebas bioquímicas tal como muestra la Tabla 11: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Citrobacter* y dos cepas no identificadas. Los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium* y *Aeromonas* son reportadas como bacterias de interés ambiental que degradar diferentes xenobióticos.^{7,9,42} Madigan *et al.*⁴⁴ en año 2013 hacen referencia sobre el género *Klebsiella* como bacteria degradadora de pesticidas, mientras que los géneros *Serratia*, *Proteus*, *Micrococcus* y *Citrobacter* no hay reportes como bacterias degradadoras de pesticidas (carbofurán). Villegas³² en 2009 describe microorganismos más interesantes, como vectores de introducción al medio ambiente, para las actividades detoxificadoras en donde destaca el género *Pseudomonas* y sus parientes próximos; *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter* y *Acinetobacter*. De cierto el género *Pseudomonas* son conocidas como las bacterias más eficientes en la degradación de xenobióticos, de igual forma se conoce que tienen la capacidad de degradar un amplio rango de pululantes aromáticos.

Por otra parte las literaturas hacen referencia sobre el uso de bacterias individuales en la degradación de ciertos pesticidas como la *Pseudomonas spp.* y *Flavobacterium sp.*⁵⁰ Gunner y Zuckerman citado por Wang *et al.*³⁶ en 2007 menciona la degradación de plaguicidas por efecto sinérgico de dos o más microorganismos como el *Arthrobacter sp.* con *Streptomyces sp.* también cita a Karns *et al.* quienes encontraron que un *Achromobacter* aislado de suelo tratado

con carbofurán que hidroliza también otros carbamatos; y a Read quien encontró los géneros *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Achromobacter* y *Bacillus* degradadores de aldicarb.

VI. CONCLUSIONES

1. El consorcio de bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán, aisladas de suelos agrícolas de Chiara están conformadas por los géneros: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Citrobacter* y dos cepas no identificadas.
2. La actividad biodegradadora de carbofurán realizada por el consorcio bacteriano muestra una capacidad de remoción hasta del 83% respecto a la concentración inicial; desarrollado bajo condiciones de laboratorio a 30 °C en constante agitación en medio mineral Busnell Hass durante 30 días.
3. La actividad biodegradadora del consorcio bacteriano está influenciada por la concentración de carbofurán, logrando remover mayor cantidad de pesticidas a las concentraciones iniciales de 30 y 40 mg/l de carbofurán.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con esta línea de investigación para determinar biodegradación de carbofurán *in situ* y en otros plaguicidas.
2. Optimizar los diferentes parámetros para su posterior aplicación en la biorremediación.
3. Determinar biodegradación de carbofurán por hongos aisladas de suelos agrícolas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Badii M, Garza V. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. CULCy//Impacto Ecológico [revista en Internet] 2007 enero-febrero. [acceso 19 de octubre de 2012]; 4(18): 9-25. Disponible en: <http://www2.uacj.mx/IIT/CULCYT/Enero-Febrero2007/5ARTCULOBADII.PDF>
2. Murugesan A, Jeyasanthi T, Maheswari S. Isolation and characterization of cypermethrin utilizing bacteria from Brinjal cultivated soil. African Journal of Microbiology Research [revista on-line] 2010 enero. [Acceso 30 de agosto de 2012]; 4(1): 10-13. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/ajmr>
3. Mostafa Gamal AE. Electrochemical biosensors for the detection of pesticides. The open electrochemistry journal [revista en internet] 2010 marzo-junio. [acceso 19 de octubre de 2012]; 2(1): 22-42. Disponible en : <http://www.benthamscience.com/open/toelecj/articles/V002/22TOELECJ.pdf>
4. Beshay U, Haleem D, Abd A, Moawad H, Zaki S. Phenol biodegradation by free and immobilized Acinetobacter. African Journal of Biotechnology [revista en Internet] 2002 enero. [acceso 20 de octubre de 2012]; 2(1): 8-12. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/AJB>
5. Ortiz-Hernández L, Monterrosas M, Yañes G, Sánchez E. Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. Rev. Int. Contam. Amb. [revista en internet] 2001 enero- junio. [acceso 3 de noviembre de 2012]; 17(3): 147-155. Disponible en: <http://132.247.146.34/index.php/rica/article/view/25524>
6. Mbogo S. La caracterización metodológica y degradación bacteriana del carbofuran de las tierras de granjas hortícolas en el Valle de la Hendedura y Kenya Central. En libro de ponencias: X congreso latinoamericano de ciencias del mar. Costa Rica; 2011.p.23-31.
7. Castrejón M, Sánchez E, Ortiz L. Caracterización e identificación de consorcios bacterianos capaces de crecer sobre plaguicidas organofosforados. [monografía en internet]. México: Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2009 [acceso 19 de noviembre de 2012]. Disponible en: <http://www.uaemex.mx/Red-Ambientales/docs/memorias/Extenso/CA/EC/CAC-04.pdf>
8. Gómez M, Campos NH, Dussán J, Suárez A. Selección de un consorcio bacteriano aeróbico de la Ciénaga Grande de Santa Marta con capacidad degradadora del plaguicida organoclorado (aldrin). En: Libro de Ponencias: X Congreso Latinoamericano del ciencia del Mar. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras. Gobierno de Colombia; 2003. p. 2-5.
9. Carrillo E, Ruiz A, Yeomans H. Aislamiento, identificación y evaluación del consorcio mixta de microorganismo con capacidad para degradar DDT. Rev. Int. Contam. Ambient. [revista en internet] 2004 enero-marzo. [acceso 17 de setiembre de 2012]; 20(2): 69-75. Disponible en: http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/TLAXCALA%202009/REVISTA/contaminacion/acervo/vol_20_2/3.pdf

10. Quispe Atauje M. Identificación de bacterias degradadoras de pesticidas, organofosforados y carbamatos, aisladas de suelos de cultivos. [Tesis de grado]. Ayacucho (Perú): Oficina de Biblioteca y Revistas, Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga; 2001.
11. Donato T. Xenobióticos y Reacciones de Biotransformación. [monografía en internet]. España: Centro de Investigación de Valencia; 2012 [acceso 27 de noviembre de 2012]. Disponible en: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Metabolismo-De-Xenobioticos/4438350.html>
12. Organización Mundial de la Salud. Caracterización de peligros en los alimentos y el agua: directrices. Informe de un Grupo Científico de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. Ginebra (Suiza). OMS; 2003. Serie de Informes Técnicos: 3. Disponible en <http://www.who.int/foodsafety/publication/micro/en/spanish.pdf>.
13. Alberos Romano M. Determinación de residuos de contaminantes orgánicos en miel y zumos. [tesis de grado]. España. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 2009.
14. Costa L, Galli C, Murphy S. Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives. 6ª ed. Berlín: Springer-Verlag; 1987. Disponible en: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19901138054.html;jsessionid=6C38EE60B03F00EB18D0C25B28390772>
15. Shepard H. The chemistry and toxicology of insecticides. Burgess Publ. Co. [revista en internet] 1939 enero. [acceso 23 de octubre de 2012]; 30(1): 31. Disponible en: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19400500242.html>
16. Hernández J. Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar [tesis de grado]. Mérida: Oficina de publicaciones de Ciencia y Tecnología. Universidad de la Laguna; 2005.
17. Fernández N, Pujol E, Maher E. Los plaguicidas aquí y ahora. Ministerio de Educación de Buenos Aires. Argentina. 2012.
18. Wood A. Compendio de los Nombres Comunes de los Pesticidas. Universidad de Minnesota, educador y empleador igualitario. 2004.
19. Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores de New Jersey (DESAPEM). Hoja Informativa sobre Sustancias Peligrosas. Estados Unidos. 2005.
20. Maldonado A, Martínez L. Impacto de las fumigaciones aéreas en las bananeras de Las Ramas- Salitre-Guayas. Rev. Acción Ecológica [revista en internet] 2007 enero. [acceso 22 de noviembre de 2012]; 8(2): 54. Disponible en: <http://www.rap-al.org/db-files/Plaguicidas-InfoPa-Ecuador-Fumig-Aereas-Banan-07.pdf>
21. Rodríguez L. Biodegradación y Persistencia del Paratión Metílico en Suelos, por Flavobacterium [tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2000.
22. Tecnología Química y Comercio. Ficha técnica de actividades. Perú: Departamento de comercialización; 2012.

23. Souza Casadinho S. La problemática del uso de plaguicidas en argentina. *Ecotimes* [revista en internet] 2007 enero-febreo.[acceso 4 de octubre de 2012]; 2(1): 2-7. Disponible en: <http://www.rap-al.org/articulos-files/Plaguicidas-Argentina.pdf>
24. Bandala J, Torres L. Chlorinated Pesticides (2,4-D and DDT) Biodegradation at High Concentrations Using Immobilized *Pseudomonas Fluorescens*. *Journal of Environmental Science and Health* [revista en internet] 2005 octubre. [acceso 27 de octubre de 2012]; 40(4): 571-583. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/PFC-200061545>
25. Ortega C, Espinosa T, López C. El Control de Riesgos para la Salud Generados por Plaguicidas Organofosforados en México [revista en internet] 1994 noviembre-diciembre. [acceso 3 de noviembre de 2012]; 36(6): 624-632. Disponible en: <http://bvs.insp.mx/rsp/-files/File/1994/num%20%206/el%20control%20de%20los%20riesgos.pdf>
26. Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA), 2008. Disponible en: <http://www.epa.gov>
27. Servicio Nacional de Sanidad Agraria Perú (SENASA). Informe técnico general de actividades anuales. SENASA Vegetal. Ayacucho. 2012.
28. Mulas F. Tratamiento y recuperación de suelos contaminados. [Monografía en Internet]* Madrid: 2008. [acceso 20 de noviembre de 2012]. Disponible en: <http://www.bioremediationgroup.org/>
29. Jones R, Norris F. Factors affecting degradation of aldicarb and ethoprop. *Journal of Nematology* [revista en internet] 1998 diciembre. [acceso 21 de noviembre de 2012]; 30(1): 45-55. Disponible en: <http://www.musalit.org/pdf/IN050654-es.pdf>
30. Waliszewski S, Aguirre A, Valencia R, Infanzon R. esterres de ftalatos – factor orquitoloxico. *Rev. Int. Contm. Ambient.* [revista en internet] 2002 enero – febrero. [acceso 20 de setiembre de 2012]; 18(2): 91-105. Disponible en: <http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=30.%09waliszewski%20s%2C%20aguirre%20a%2C%20valencia%20r%2C%20%20infanzon%20r.%20factores%20que%20influyen%20en%20la%20cinetica%20y%20el%20metabolismo%20de%20las%20plaguicidas&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCkQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.revistas.unam.mx%2Findex.php%2Frica%2Farticle%2Fdownload%2F25286%2F23755&ei=ugr5UYygCpP-9gSd-YDABg&usq=AFQjCNFay86gj6N7NrutiAjdyVMYaoNBQQ>
31. Barrett M. The role of cytochrome P450 enzymes in herbicide metabolism. (eds. Cobbs AH y Kirkwood RC), Sheffield, Great Britain, Sheffield Academic, 2000. pp. 25-37.
32. Villegas S. Aislamiento de microorganismos degradadores de 2,4,6-trinitrotolueno a partir de ambientes contaminados con explosivos [tesis de maestría]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Microbiología Industrial; 2009.
33. Marín M. Regulación de la degradación de alcanos en tres estirpes bacterianas aisladas de lugares contaminados por petróleo [tesis doctoral]. Madrid: Centro Nacional de Biotecnología. Universidad Autónoma de Madrid. 2001.

34. Atias R, Bartha R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 5ª ed. Madrid: Pearson Educacion, S.A.; 2005.
35. Venosa A, Zhu X. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. Spill Science & Technology Bulletin [revista en internet] 2003 abril. [acceso 20 de diciembre]; 8(2): 163-178. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-2561\(03\)00019-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-2561(03)00019-7)
36. Wang Y, Tian Y, Han B, Zhao H, Bi J, Cai B. Biodegradation of phenol by free and immobilized Acinetobacter sp. Journal of Environmental Sciences [disponible en internet] 2007 junio. [acceso 13 de noviembre de 2012]; 19 (2): 222-5. Disponible en: <http://www.biointeractions.org/ijip/VOL20N12007WEB.pdf>
37. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbialógico. 6ª ed. Argentina: Edit. Medica Panamericana. 2006. disponible en: <http://www.riconmedico.org>
38. Dirección Regional de Agricultura. Informe técnico final de producción agraria y Económica Regional de Ayacucho. Perú: Gerencia de Desarrollo Económico. 2012.
39. Gobierno Regional de Ayacucho, Proyecto de Zonificación Ecológica y Económica (G.R.A.-ZEE). Perú: Informe técnico final del Proyecto de Zonificación Ecológica y Económica Regional. Gerencia de Desarrollo Económico: Subgerencia de Medio Ambiente; 2012.
40. García E, y Garzón L. Evaluación de bioestimulación en suelos con hidrocarburos utilizando respirometría. scopus scielo pubindex [revista en internet] 2011 enero-marzo. [acceso 15 de octubre de 2012]; 16(1): Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/11308/28148>
41. Mosquera B, Peñuela M. Biodegradación del malatión utilizando microorganismos nativos de suelos agrícolas. Rev Colomb Cienc Pecu [revista en internet] 2009 enero-marzo, [acceso 19 de setiembre de 2012]; 22(2): 189-198. Disponible en: <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/390>
42. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. AA. 1226, Medellín, Colombia. Docente Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 2009.
43. Mendoza J, Perea Y, Jaime S, Janette A, Pérez G. Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. ACI [revista en internet] 2011 abril mayo, [acceso 3 de octubre de 2012]; 2(3): 45-55. Disponible en: http://www.erevistas.csic.es/ficha_articulo.php?url=oai_revista581:58&oai_ide_n=oai-revista581
44. Madigan M, Martinko J, Parker J, Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid: Prentice Hall Iberia. 2003. p. 978-990.
45. Ajona J, Vidal A, The use of CPC collectors for detoxification of contaminated water solar energy: Design, construction and preliminary results. Solar Energy [revista en internet] 2000 enero, [acceso 28 de agosto de 2012]; 68(1): 109-120. Disponible en: <http://www.researchgate.net/publication/222140368-The>

use-of-CPC-collectors-for-detoxification-of-contaminated-water-Design-construction-and-preliminary-results

46. Stoorvogel J, Jaramillo R, Merino R, Kosten S. Plaguicidas en el Medio Ambiente. Natural Resource Management [revista en internet] 2003 [acceso 12 de noviembre de 2012]; 67(2): 49-69. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S036528072007000200002&script=sci-arttext&lng=pt>
47. López R. Adsorción, disipación y movimiento de simazina en el suelo arenoso de un viñedo del valle de Casablanca [tesis de maestría]. Santiago: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Pontificia Universidad Católica de Chile, 2004.
48. Seo J, Keum Y, Harada R, Li Q. Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAHs-contaminated soil in Hilo. Agric. Food Chem [revista en internet] 2007 junio, [acceso 2 de noviembre de 2012]; 55 (14): 5383–5389. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672333/>
49. Chaudhry R, Mateen A, Kaskar B, Sardessai M, Bloda M, Bhatti A, et al. Induction of carbufuran oxidation to 4-hydroxycarbofuran by *Pseudomonas* sp.50432. FEMS Microbiol Lett [revista en internet] 2002 setiembre. [acceso en 10 e3 setiembre de 2012]; 214(2): 171–176. Disponible en: <http://www.mendeley.com>.
50. Sethunathan N, Yoshida T. A *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. Can J Microbiol [revista en internet] 1973 julio. [acceso 20 de octubre de 2012]; 19(7): 1512-1518. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m73138journalCode=cjm#.UfMLQNJyGE4>
51. Nagaraja P, Bhaskara B. Sensitive spectrophotometric assessment of carbofuran using dapsone as a new chromogenic reagent in formulations and environmental samples. Eclética Química [revista en internet] 2006 enero-diciembre. [acceso 2 de noviembre de 2012]; (31)4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702006000400006>.

ANEXOS

Anexo 1

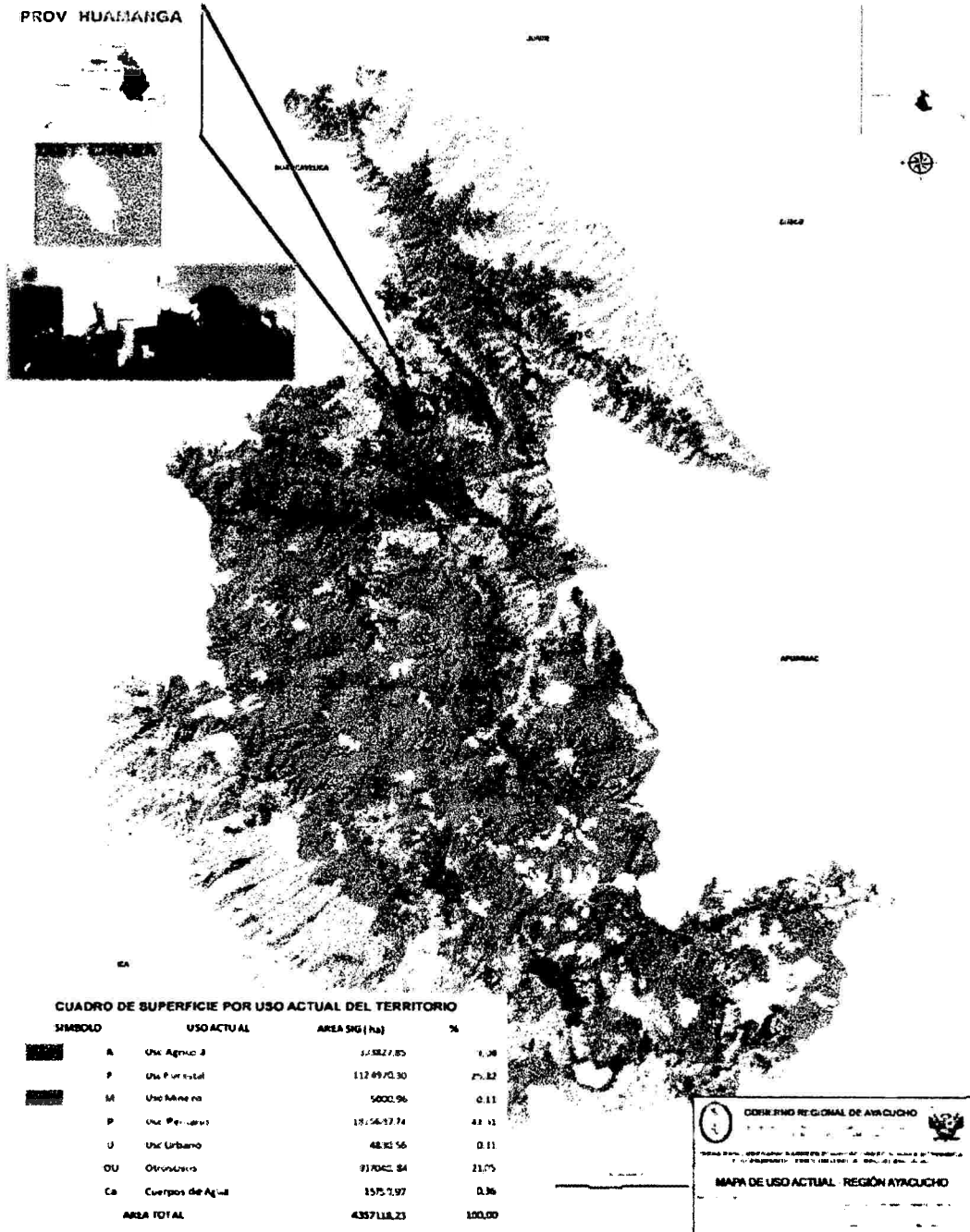


Figura 14. Mapa de uso actual del territorio regional de Ayacucho y zona de muestreo.³⁹

Anexo 2



Figura 15. Modo de aplicación del plaguicida en el cultivo de *Solanum* sp. "papa".

Anexo 3



Figura 16. Terrenos agrícolas del Distrito de Chiara.

Anexo4

Tabla 13. Rendimiento de cultivos campaña agrícola del Distrito de Chiara.

Principales cultivos	Siembra Hac	Superficie perdida/Hc	Cosecha /Hac	Rendimiento	Producción	Precio en chacra
Ajo	22,00		22,00	5,09	112,00	1,34
Alfalfa	5,00		18,00	21,00	378,00	0,32
Arveja seco	107,00	42,00	65,00	1,05	68,00	0,69
Arveja verde	106,00		106,00	2,24	237,00	0,60
Avena forraje	72,00		72,00	12,71	915,00	0,20
Avena grano	155,00		155,00	0,94	146,00	0,78
Cebada forraje	18,00		17,00	11,65	198,00	0,21
Cebada grano	229,00	66,00	163,00	0,90	146,00	0,49
Quindo			1,00	5,00	5,00	0,91
Haba seco	140,00	52,00	88,00	0,92	81,00	0,89
Haba verde	83,00		83,00	2,68	222,00	0,53
Maíz amiláceo	86,00	33,00	53,00	0,93	49,00	0,95
Maíz choclo	15,00		15,00	4,53	68,00	0,70
Mashua	6,00		6,00	3,17	19,00	0,35
Oca	7,00	2,00	5,00	3,40	17,00	0,36
Olluco	51,00	20,00	31,00	3,19	99,00	0,44
Otros pastos	1 427,00			18,33	26154,00	0,21
Papa	2 531,00	906,00	1125,00	19,07	21452,00	0,40
Quinoa	28,00	9,00	19,00	0,84	16,00	1,28
Trigo	127,00	25,00	102,00	0,21	93,00	0,66

Anexo 5



Figura 17. Terreno de cultivo de *Solanum* sp "papa" como sitios de muestreos.

Anexo 6

Tabla 14. Composición del medio de cultivo Busnell Hass.⁴¹

Ingrediente	Cantidad
KH_2PO_4 : Fosfato mono potásico	1 g/l
K_2HPO_4 : Fosfato di potásico	1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Sulfato de magnesio	0,2 g/l
CaCl_2 : Cloruro de calcio	0,02 g/l
NH_4NO_3 : Nitrato de amonio	1 g/l
$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Cloruro de Hierro	0,05 g/l

Nota. Llevar a 1l con agua destilada, ajustar el pH a 7,00 homogenizar bien. Esterilizar en autoclave 121 °C, 15Lb/Pulg² por 15 minutos.

Anexo 7



Figura 18. Representación comercial de carbofurán (Furadán 4F®).

Anexo 8



Figura 19. Agitador horizontal de frascos de vidrio.

Anexo 9



Figura 20. Sitio de experimentación para aislamiento y biodegradación de carbofurán.

Anexo 10

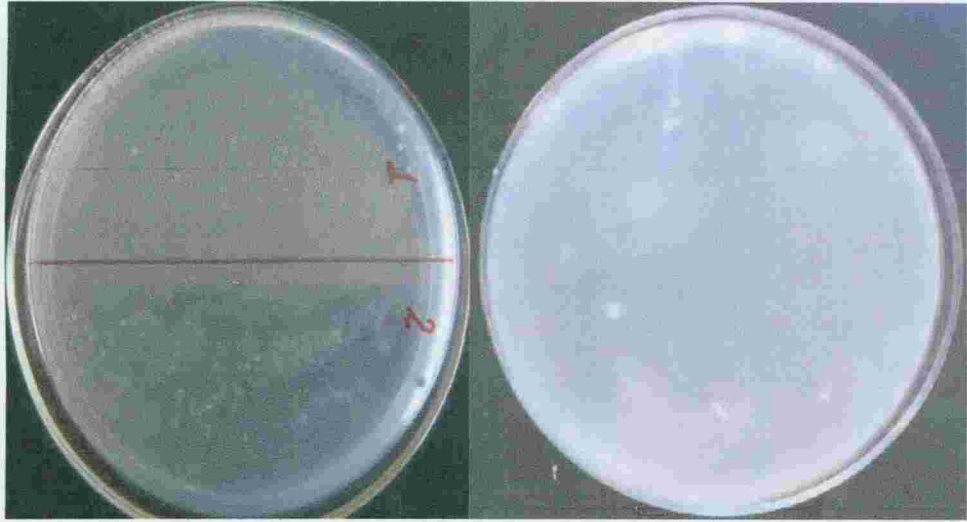


Figura 21. Colonias sobre agar Busnell Hass enriquecido con carbofurán.

Anexo 11

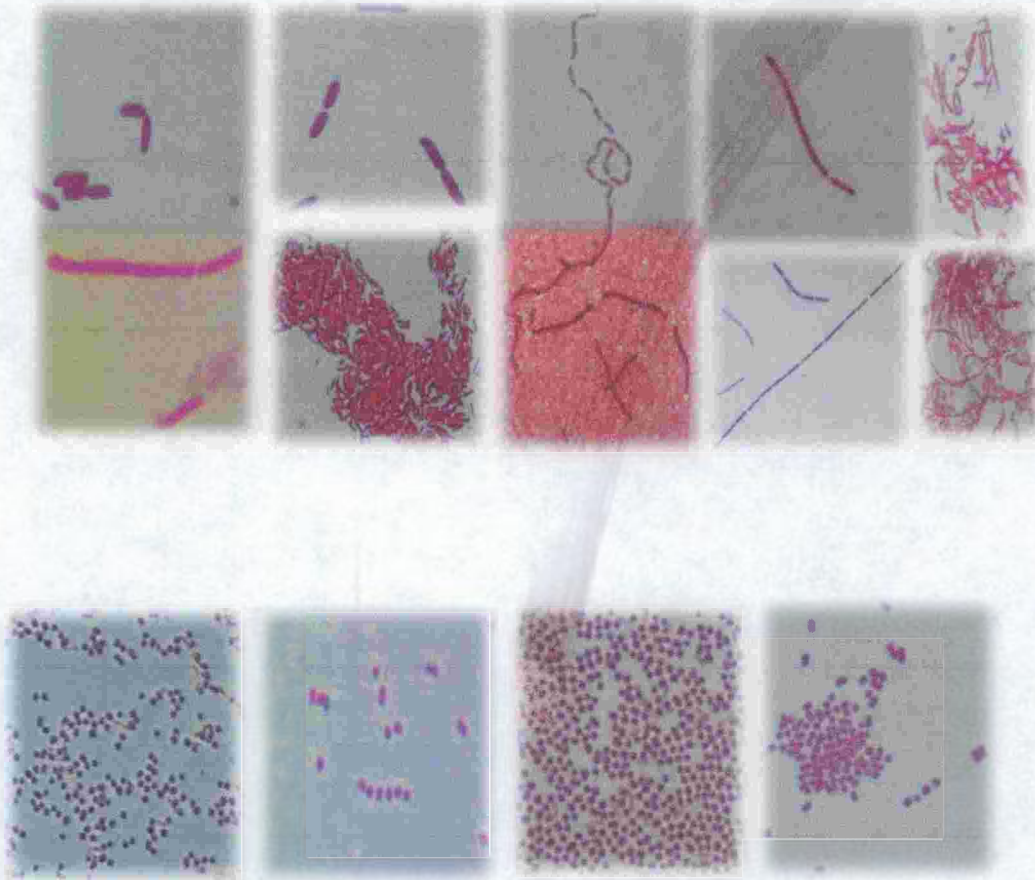


Figura 22. Observación microscópica de la coloración Gram de las bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán.

Anexo 12

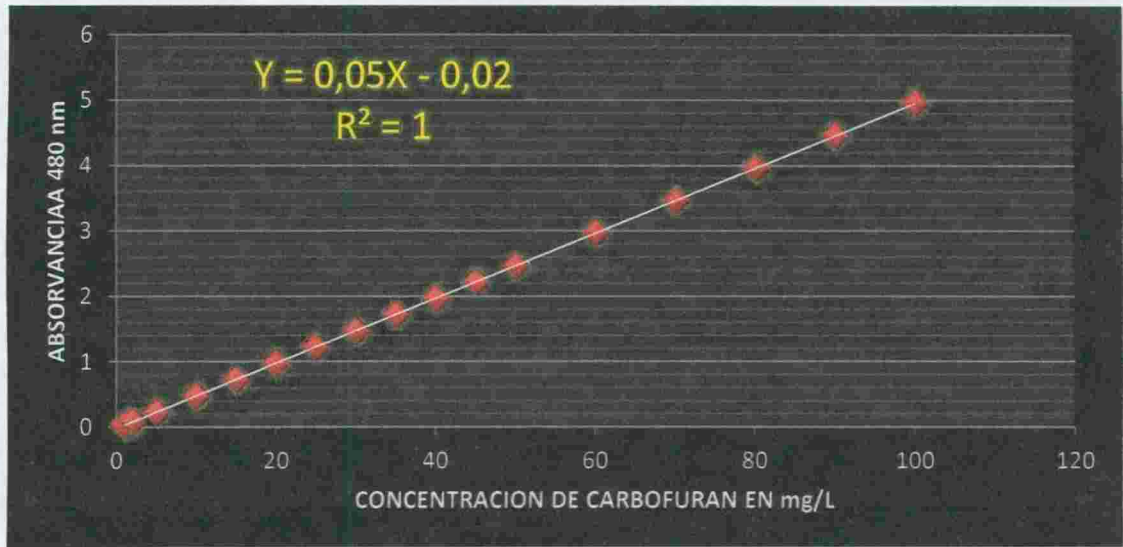


Figura 23. Curva y ecuación patrón estandarizada.

Anexo 13

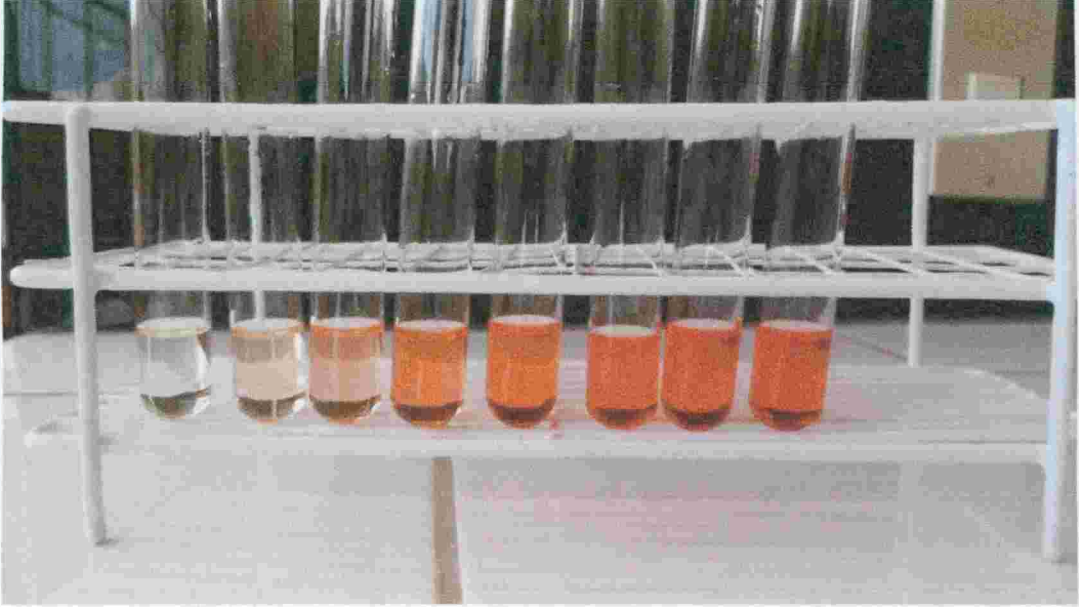


Figura 24. Tubos de prueba de resultados de reacción cromogénica de DAPSONA.

Anexo 14

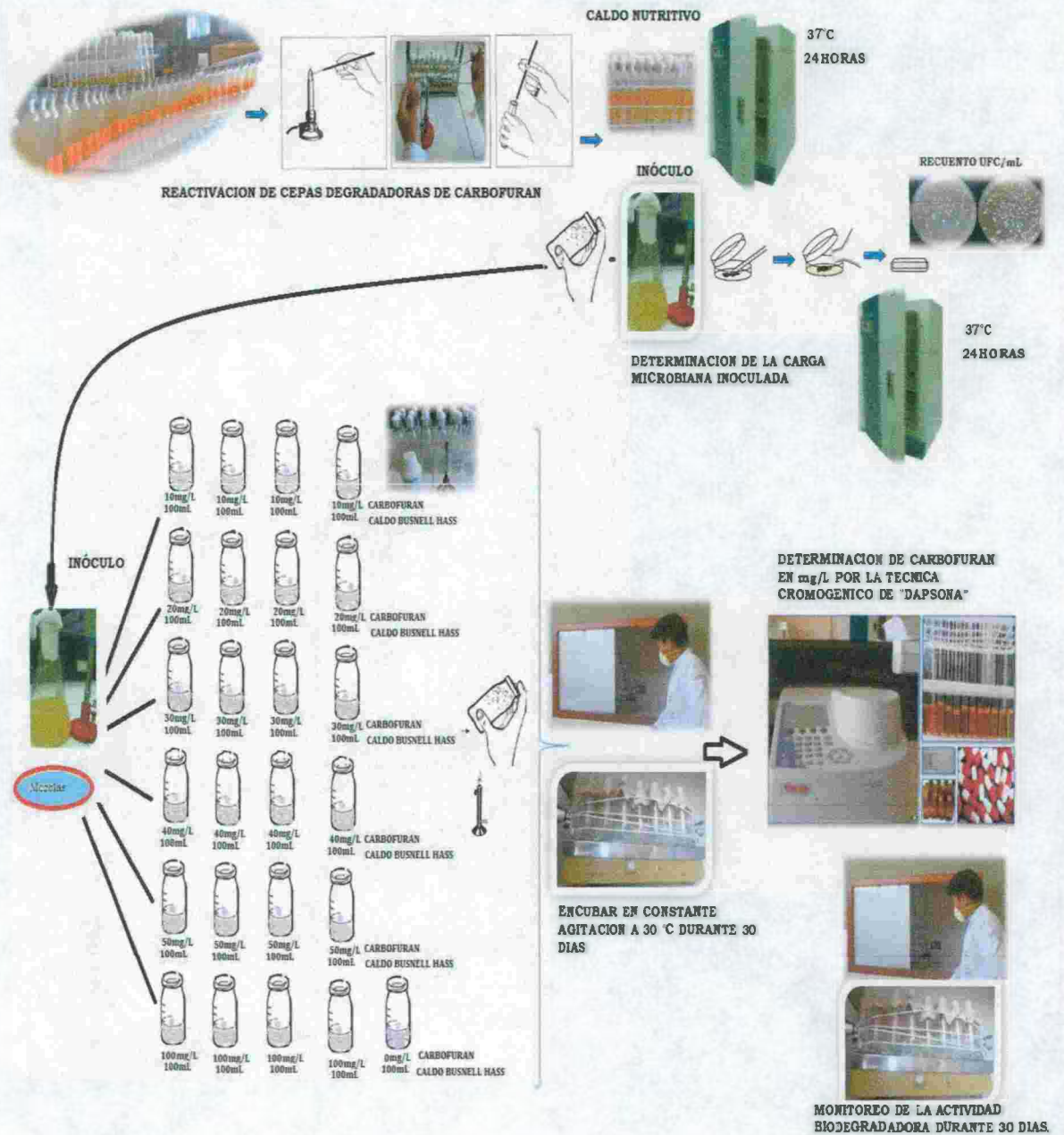
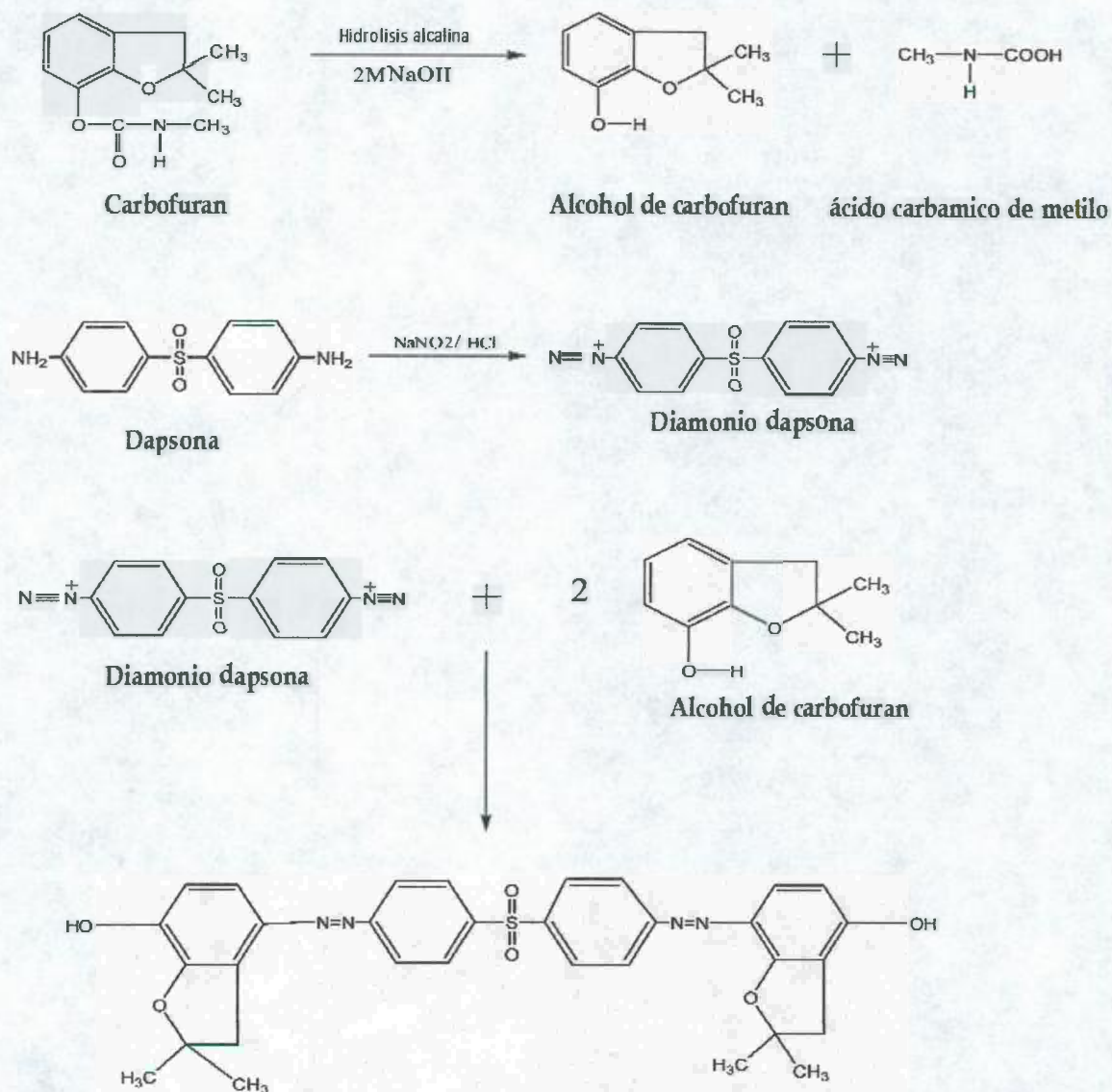


Figura 25. Flujograma del ensayo de biodegradación de carbofurán

Anexo 15



EL PRODUCTO ES UN COMPLEJO DE COLOR ANARANJADO (M_{ax} Abs. 480 nm)

Figura 26. Reacciones químicas de carbofurán con DAPSONA en el medio alcalino.⁵¹

Anexo 16



Figura 27. Representación y características de DAPSONA.

- Nombre químico: 4,4-diaminodifenilsulfona.
- Formula molecular: $C_{12}H_{12}N_2O_2$.
- Peso molecular: 248,30 g/mol.
- Características físicas: polvo cristalino blanco y amarillo pálido sin olor.
- Punto de fusión: 175-176 °C.
- Solubilidad: casi insoluble en el agua, ligeramente soluble en el etanol y muy soluble en el acetona.
- Características especiales: producto fotosensible.

Dapsona es un antibiótico, está disponible comercialmente en el mercado como "Dapsona" o "Avlosulfon" generalmente se utiliza para combatir lepra o un problema de la piel llamada *dermatitis herpetiforme* y las personas con VIH* también usan este antibiótico para combatir las infecciones oportunistas.⁵¹

Anexo 17

Tabla 15. Valores de carbofurán en mg/l en diferentes tratamientos de carbofurán según repeticiones de biodegradación.

N°	[] mg/l	Primera repetición						Segunda repetición							
		0° día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	30° día	0° día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	30° día
1	10 mg/l	9,95	5,86	4,01	3,43	2,24	1,44	1,27	10,53	5,62	4,13	3,37	2,70	2,34	2,06
2	20 mg/l	18,64	12,42	10,51	9,95	8,46	7,79	7,43	18,74	12,50	9,97	9,95	8,32	6,65	6,42
3	30 mg/l	27,85	18,90	18,03	16,51	16,45	14,88	14,45	30,79	18,05	16,14	16,51	16,28	15,19	14,76
4	40 mg/l	43,11	31,13	29,26	26,75	26,43	24,39	24,05	42,74	33,75	30,97	26,75	23,14	20,31	20,03
5	50 mg/l	52,94	44,80	40,63	37,45	34,35	32,40	32,08	52,62	44,39	40,87	37,45	34,65	32,22	31,78
6	60 mg/l	59,04	53,06	50,85	49,38	48,19	46,42	45,88	58,69	53,87	50,95	49,38	48,28	46,63	46,22

N°	[] mg/l	Tercera repetición						Blanco negativo							
		0° día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	30° día	0° día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	30° día
1	10 mg/l	10,19	5,66	3,97	3,47	2,64	2,29	1,86	9,95	9,60	9,38	9,22	9,04	8,74	8,64
2	20 mg/l	18,05	12,10	10,43	9,72	8,44	7,89	7,55	18,74	18,56	18,38	18,34	18,12	17,83	17,53
3	30 mg/l	30,45	19,14	18,05	16,97	15,46	14,27	14,01	28,01	27,85	27,71	27,55	27,35	27,11	26,95
4	40 mg/l	42,96	32,70	30,19	28,05	26,38	20,91	20,73	42,86	42,70	40,57	40,53	40,31	39,97	39,72
5	5 mg/l	52,76	47,27	43,85	38,36	33,41	30,51	29,79	52,62	52,38	52,24	51,89	51,72	51,13	51,03
6	60 mg/l	58,96	55,92	53,33	50,61	47,03	46,32	45,74	59,10	59,00	58,84	58,58	58,24	57,73	57,59

Anexo 18

Tabla 16. Valores de absorbancia en relación a diferentes concentraciones de carbofurán según repeticiones de biodegradación.

N°	[] mg/l	Primera repetición							Segunda repetición						
		0° día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	30° día	0° día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	30° día
1	10 mg/l	0,48	0,27	0,18	0,15	0,09	0,05	0,04	0,50	0,26	0,19	0,15	0,12	0,09	0,08
2	20 mg/l	0,91	0,59	0,50	0,48	0,40	0,37	0,35	0,01	0,60	0,48	0,48	0,39	0,31	0,30
3	30 mg/l	1,37	0,92	0,88	0,80	0,79	0,72	0,70	1,51	0,88	0,78	0,80	0,79	0,745	0,71
4	40 mg/l	2,12	1,53	1,44	1,31	1,29	1,19	1,18	2,11	1,66	1,52	1,31	1,13	0,99	0,98
5	50 mg/l	2,61	2,21	2,00	1,84	1,69	1,59	1,58	2,59	2,19	2,01	1,84	1,70	1,58	1,56
6	60 mg/l	2,92	2,62	2,51	2,44	2,38	2,29	2,26	2,89	2,66	2,51	2,44	2,38	2,29	2,28

N°	[] mg/l	Tercera repetición							Blanco negativo						
		0° día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	30° día	0° día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	30° día
1	10 mg/l	0,49	0,26	0,18	0,15	0,11	0,09	0,07	0,48	0,46	0,45	0,44	0,43	0,42	0,41
2	20 mg/l	0,88	0,58	0,50	0,46	0,40	0,37	0,36	0,91	0,90	0,89	0,89	0,88	0,87	0,85
3	30 mg/l	1,49	0,93	0,88	0,82	0,75	0,69	0,68	1,37	1,37	1,36	1,35	1,34	1,33	1,32
4	40 mg/l	2,12	1,61	1,48	1,38	1,29	1,02	1,01	2,11	2,10	1,99	1,99	1,98	1,97	1,96
5	5 mg/l	2,60	2,33	2,16	1,89	1,64	1,49	1,46	2,59	2,58	2,58	2,56	2,55	2,52	2,52
6	60 mg/l	2,91	2,76	2,63	2,49	2,32	2,28	2,26	2,26	2,92	2,91	2,89	2,88	2,85	2,84

Anexo 19

Tabla 17. Análisis de varianza de la biodegradación de carbofurán.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	f	Sig.
Inter-grupos	36 616,67	117	312,96	18,78	0,00
Intra-grupos	133,33	8	16,67		
Total	36 750,00	125			

Anexo 20

Tabla 18. Resumen del procesamiento de los casos del ensayo de biodegradación de carbofurán.

Tratamiento	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
10 mg/l	28	100,0%	0	0,0%	28	100,0%
20 mg/l	28	100,0%	0	0,0%	28	100,0%
30 mg/l	28	100,0%	0	0,0%	28	100,0%
40 mg/l	28	100,0%	0	0,0%	28	100,0%
50 mg/l	28	100,0%	0	0,0%	28	100,0%
60 mg/l	28	100,0%	0	0,0%	28	100,0%

[] carbofurán

Anexo 21

Tabla 19. Matriz de consistencia.

Título	Problema	Objetivos	Marco Teórico	Variable	Metodología
Biodegradación de carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Chiara, Ayacucho 2012	¿Cuál es la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas del Distrito de Chiara, Ayacucho 2012?	Objetivo general Evaluar la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas del Distrito de Chiara, Ayacucho 2012. Objetivos específicos: Aislar bacterias con capacidad degradadora del carbofurán de suelos agrícolas del Distrito de Chiara, Ayacucho 2012. Identificar los principales géneros de bacterias con capacidad degradadora del carbofurán aisladas de suelos agrícolas del Distrito de Chiara, Ayacucho 2012. Determinar la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas del Distrito de Chiara, Ayacucho 2012.	2.1. Evolución de los pesticidas 2.2. Química de los pesticidas 2.2.1. Insecticidas organoclorados 2.2.2. Insecticidas organofosforados 2.2.3. Insecticidas carbamatos a. Carbofurán b. Usos c. Modo de acción d. Persistencia e. Efectos en la salud f. Efectos en el medio ambiente 2.3. Biorremediación 2.3.1. Tipos de Biorremediación 2.3.2. Degradación microbiana de plaguicidas a. Detoxificación b. Degradación c. Conjugación 2.3.3. Géneros de heterótrofos que usan pesticidas 2.4. Antecedentes	Variables en estudio: ✓ Bacterias degradadoras de carbofurán. ✓ Grado de biodegradación del carbofurán Indicadores: ➤ Género de bacterias degradadoras de carbofurán ➤ Concentración de carbofurán en mg/l. 4. Hipótesis Si los suelos agrícolas del Distrito de Chiara están sometidas a constante fumigación con diversos pesticidas, por lo tanto la microbiota está expuesta a estas sustancias xenobióticas entonces es posible hallar bacterias degradadoras de pesticidas como carbofurán.	Nivel de investigación: Básica Tipo de investigación: Descriptivo Diseño: Transversal Método: Analítico Población: Suelos agrícolas del Distrito de Chiara y sus respectivos microbiota. Muestra: Suelos agrícolas y su respectivo microbiota de mayor actividad agraria de <i>Solanum tuberosum</i> "papa" y de mayor asistencia de insecticidas seleccionadas al azar de la comunidad de Chiara Equipo: Microscopio, Espectrofotómetro

BIODEGRADACIÓN DE CARBOFURÁN POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS AGRÍCOLAS. AYACUCHO-2012

Edgar Yony Chuchón Conde¹. Saúl Alonso Chuchón Martínez¹

¹Biología: UNSCH

RESUMEN

La actividad agrícola en la zona de Chiara está sometida al uso constante de agroquímicos principalmente de insecticidas (carbofurán), lo cual con el tiempo genera graves problemas en la salud del hombre y la estabilidad ambiental. Ante esta situación es necesario generar alternativas para el tratamiento de residuos de estos productos. La presente investigación tiene como objetivo principal evaluar la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas de Chiara, en condiciones de laboratorio. La investigación es de tipo básica, nivel descriptivo, diseño transversal - analítico. La toma de muestra se realizó en suelos agrícolas contaminados con carbofurán por método no probabilístico o por conveniencia en la localidad de Chiara, durante los meses de agosto y setiembre de 2012. A partir de tales muestras se aislaron bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán utilizando caldo Busnell Hass con 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l de carbofurán (medio líquido), seguido en agar Busnell Hass con 30 mg/l de carbofurán, (medio sólido), posteriormente purificadas en agar nutritivo e identificadas mediante características culturales, microscópicas y bioquímicas. El ensayo de biodegradación de carbofurán se realizó con tratamientos a 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/l de carbofurán por un periodo de 30 días y evaluadas con la técnica cromogénica de DAPSONA, en la cual se obtuvieron resultados que muestran una biodegradación hasta 83%, 61%, 51%, 50%, 41% y 22% respectivamente, resulta a la vez la influencia de concentraciones de carbofurán sobre la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano, lo cual fue contrastada por análisis de varianza. En conclusión, el consorcio bacteriano aislado de suelos agrícolas de Chiara con capacidad biodegradadora de carbofurán está integrado por los géneros: Bacillus, Pseudomonas, Flavobacterium, Klebsiella, Serratia, Proteus, Corynebacterium, Micrococcus, Aeromonas, Citrobacter y dos cepas no identificadas; quienes han logrado una máxima biodegradación en los tratamientos 40 mg/l y 50 mg/l hasta 18,6 mg y 20,9 mg de carbofurán respectivamente, logrando mayor biodegradación en los 10 primeros días de incubación.

Palabras claves: plaguicidas, carbofurán, consorcio bacteriano, biodegradación.

SUMMARY

The agricultural activity in the area of Chiara is subjected to the constant to the agriculture-chemical use mainly of insecticides (carbofurán), that which there is generating severe problems in the man's health and the environmental stability with the time. Before this situation it is necessary to generate alternatives for the treatment of residuals of these products. The present investigation has as main objective to evaluate the capacity biodegradadora of the carbofurán for isolated bacterial of agricultural floors of Chiara, under laboratory conditions. The investigation is of basic type, descriptive level, I design traverse - analytic. The taking of sample was carried out in polluted agricultural floors with carbofurán for method non probabilistic or for convenience in the town of Chiara, during the months of August and September of 2012. Starting from such samples bacterial were isolated with capacity carbofurán biodegradadora using broth Busnell Hass with 5, 10, 20, 30, 40 and 50 carbofurán mg/l (half liquid), continued in agar Busnell Hass with 30 carbofurán mg/l, (half solid), later on purified in nutritious and identified agar by means of characteristic cultural, microscopic and biochemical. The rehearsal of carbofurán biodegradation was carried out with treatments at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 carbofurán mg/l for a period of 30 days and evaluated with the technical cromogénica of DAPSONA, in which results were obtained that they show a biodegradation up to 83%, 61%, 51%, 50%, 41% and 22% respectively, it is the influence of carbofurán concentrations at the same time on the activity biodegradadora of the bacterial consortium, that which was contrasted by variance analysis. In conclusion, the isolated bacterial consortium of agricultural floors of Chiara with capacity carbofurán biodegradadora is integrated by the goods: Bacillus, Pseudomonas, Flavobacterium, Klebsiella, Serratia, Proteus, Corynebacterium, Micrococcus, Aeromonas, Citrobacter and two non-identified stumps; who have achieved a maximum biodegradation in the treatments 40 mg/l and 50 mg/l until 18,6 mg and 20,9 carbofurán mg respectively, achieving bigger biodegradation in the first 10 days of incubation.

Key words: pesticides, carbofuran, bacterial consortia, biodegradation.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la sociedad contemporánea en las últimas décadas está asociado al uso de compuestos sintéticos conocidos como xenobióticos, los cuales entran directa o indirectamente al ambiente, contaminando y generando problemas en la salud del hombre. Agentes xenobióticos como los plaguicidas, son ampliamente utilizados en la agricultura de todo el mundo debido a su alta rentabilidad.¹ Pero a la vez el uso de diversas plaguicidas, sin negar su contribución al incremento de la productividad agrícola a nivel mundial, contribuye a la contaminación ambiental, afectando principalmente cuerpos de agua debido al uso indiscriminado e inadecuado de ellos, generando un grave desequilibrio en los ecosistemas.²

La presencia de residuos y/o metabolitos de plaguicidas en el alimento, agua, aire y suelo representa actualmente uno de los temas importantes para la química ambiental.³ Existe una gran variedad de métodos físicos y químicos para tratar los suelos y mantos acuíferos contaminados por estas sustancias, pero muchos de estos tratamientos no destruyen los compuestos peligrosos sino que los transfieren de una fase a otra, por lo que el tratamiento biológico en el que se transforman estos compuestos peligrosos en compuestos más simples sigue siendo un desafío importante en la actualidad.⁴ La presencia de bacterias capaces de metabolizar los diferentes insecticidas ha recibido una especial atención, debido a que han sido el resultado de un proceso de evolución de poblaciones microbianas autóctonas que se han adaptado a estos contaminantes y porque proveen la posibilidad de ser usadas *in situ* en la detoxificación de ambiente severamente contaminados.⁵

La presente investigación logró evaluar la capacidad biodegradadora de carbofurán utilizando el consorcio bacteriano aislado de suelos agrícolas de la localidad de Chiara, provincia de Huamanga de la región de Ayacucho, donde según los datos de Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) en 2011 y Dirección Regional de Agricultura (DRA) en 2011 se han registrado el uso indiscriminado de agroquímicos en la actividad agropecuaria al igual que en otras zonas agrícolas del mundo. La actividad agrícola con dependencia de agroquímico hace que existan residuos de estas sustancias (carbofurán) a nivel de tierras de cultivo, agua, aire e incluso a nivel de la composición de los productos alimenticios, lo que genera problemas en la productividad de las actividades agropecuarias, equilibrio ecológico y ponen en riesgo la salud pública no solamente a nivel de la localidad de Chiara sino también a nivel regional y nacional, a

través del consumo y comercialización de alimentos básicos (*Solanum sp.* "papa"). Pero a la vez, la presencia de residuos de estas pesticidas en el medio ambiente permite que existan microorganismos (bacterias) con capacidad biodegradadora de sustancias tales como carbofurán. El aislamiento, identificación y el conocer la capacidad biodegradadora es una investigación básica, nivel descriptivo, diseño transversal - analítico en condiciones de laboratorio que forma parte esencial para el desarrollo de un gran proyecto de biorremediación de suelos agrícolas contaminados con agroquímicos no solamente en la zona de Chiara sino a nivel regional y nacional.

Teniendo en cuenta las consideraciones indicadas en los párrafos anteriores, se ha planteado como:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Ayacucho 2012.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar bacterias con capacidad biodegradadora del carbofurán de suelos agrícolas. Ayacucho 2012.
- Identificar los principales géneros de bacterias con capacidad biodegradadora del carbofurán aisladas de suelos agrícolas. Ayacucho 2012.
- Determinar la capacidad biodegradadora del carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Ayacucho 2012.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

- Ubicación política: Distrito de Chiara, Provincia de Huamanga, Región de Ayacucho.⁶
- Ubicación geográfica: 13° 25' latitud sur y 74° 16' longitud este, de la sierra central del Perú
- Temperatura Ambiental: máxima 15,5 °C; mínima 3,5 °C y media 9,5 °C.
- Zona de vida: paramo húmedo-subalpino subtropical (ph-SAS).
- Altitud: 4 500 m.s.n.m.
- Humedad relativa: 45%.
- pH del suelo: 5,3.
- Características: suelos arcillosos limosos.

con la descripción macroscópica o cultural durante la purificación e identificación de cada uno de las cepas bacterianas aisladas. Finalmente agrupando en Gram positivo y negativo; como en coco y bacilo.

- c) **Caracterización bioquímica.** Las cepas bacterianas aisladas luego de la diferenciación cultural y microscópica se realizaron la identificación bioquímica, para lo cual se realizaron las siguientes pruebas: fermentación de lactosa, oxidasa, catalasa, TSI, LIA, citrato, indol, coagulasa, hidrólisis de urea, hemólisis, motilidad, hidrólisis de gelatina, reducción de

nitrito, crecimiento en anaerobiosis, presencia y ausencia de endospora, fermentación de manitol, sensibilidad al Na⁺, producción de CO₂, producción de SH₂.

3.4. Análisis de datos.

Con los datos obtenidos en los procedimientos anteriores se realizó análisis de estadística descriptiva para presentar los datos en forma de tablas, curvas e histogramas. Luego se realizó análisis de estadística inferencial como fue análisis de varianza con 95% de confianza, utilizando software SPSS Statistics 20 y Excel 2010.

RESULTADOS

Tabla 2. Valores del recuento de carga bacteriana en ensayos de aislamiento de las bacterias biodegradadoras de carbofurán.

Nº	ENSAYO	UFC/ml
1	BH-C50-M	6,2*10 ⁶ UFC/ml
2	BH-C40-M	8,5*10 ⁶ UFC/ml
3	BH-C30-M	8,6*10 ⁶ UFC/ml
4	BH-C20-M	8,5*10 ⁶ UFC/ml
5	BH-C10-M	8,4*10 ⁶ UFC/ml
6	BH-C5-M	8,4*10 ⁶ UFC/ml
7	BH-C30	0UFC/ml
8	BH	0UFC/ml
9	BH-M	3 UFC/ml

NOTA: Los valores mostrados son el resultado del recuento estándar en placa, a los 15 días de incubación del medio líquido. BH: medio Busnell Hass, C: concentración de carbofuran en mg/l, M: muestra de suelo.

Tabla 3. Características culturales y test Gram de cepas bacterianas con capacidad biodegradadora de carbofurán.

Clave	Características culturales	Forma	G
CPB01	Colonias grandes de bordes irregulares plana y estrellado, color blanco, consistencia blanda	Bacilos	+
CPB02	Colonias mediana, brillantes con consistencia cremosa, bordes regulares de color blanco.	Bacilos	-
CPB03	Colonias pequeñas, brillantes con consistencia cremosa, bordes regulares de color gris	Bacilos	-
CPB04	colonias medianas, cremosa con bordes regulares, con elevación mediana de color blanca	Coco	+
CPB05	Colonias medianas, brillantes de color gris, circular, bordes irregulares de consistencia cremosa	Bacilos	-
CPB06	Colonias grandes, convexas, blanquecinas o translucidas, forma circular, bordes redondeados	Bacilos	-
CPB07	Colonias grandes de color grisáceas de aspecto granuloso, traslúcidas, de bordes regulares.	Bacilos	+
CPB08	colonias medianas, cremosa con bordes regulares, planas de color gris	Bacilos	-
CPB09	Colonias pequeñas, brillantes de color amarillo, forma circular de consistencia cremosa	Bacilos	-
CPB10	Colonias medianas de bordes regulares plana de color blanco gris y una Consistencia blanda	Bacilos	-
CPB11	Colonias pequeñas brillantes de bordes regulares plana de color gris y una Consistencia blanda	Bacilos	-
CPB12	Colonias medianas de bordes regulares plana de color blanco y una Consistencia blanda	Bacilos	-
CPB13	Colonias medianas de color amarillentas , con bordes regulares de consistencia cremosa	Coco	+
CPB14	Colonias planas, de borde irregular, con centro rosado y un tono más pálido alrededor	Bacilos	-
CPB15	Colonias medianas de borde entero con elevación convexa, blanco, de consistencia cremosa	Bacilos	-
CPB16	Colonias medianas, brillantes de color gris, bordes circular de consistencia cremosa	Bacilos	-
CPB17	Colonias pequeñas de color grisáceas de aspecto granuloso, traslúcidas, de bordes regulares.	Bacilos	-
CPB18	Colonias de tamaño mediano con elevación media blanco gris y cremosa con bordes irregulares	Bacilos	-

Tabla 4. Identificación de bacterias degradadoras de carbofurán aisladas de suelos agrícolas.

№	For.	G	Lac.	Ox.	Cat.	Coag.	Hem.	Ur.	Mot.	Ind.	TSI (CO ₂)	TSI (HS ₂)	LIA	Citr.	Gel.	Nitr.	Género
	Bacilos	+	-	-	+	-	Gama	+	+	-	K/A	-	K/k	-	+	-	Bacillus
	Bacilos	-	+	-	+	-	Beta	+	-	-	A/A	-	K/k	+	-	+	Klebsiella
	Bacilos	-	+	-	+	-	Beta	+	-	-	A/A	-	K/k	+	-	+	Klebsiella
	Coco	+	-	+	-	-	Gama	+	-	-	K/k	-	K/k	-	+	+	Arthrobacter
	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	-	+	-	K/k	-	K/k	+	-	-	Serratia
	Bacilos	-	-	-	+	+	Gama	+	+	-	K/A	-	K/A	+	-	+	Proteus
	Bacilos	+	-	-	-	-	Gama	+	+	-	K/k	-	K/k	-	-	-	Corynebacterium
	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	+	-	-	K/k	-	K/k	+	+	+	Flavobacterium
	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	-	+	-	K/k	-	K/k	+	+	-	Serratia
0	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	-	-	-	K/k	-	K/k	+	-	+	No identif.
1	Bacilos	-	-	-	+	-	Gama	-	-	-	K/k	-	K/k	+	-	+	No identif.
2	Bacilos	-	+	-	+	-	Beta	+	-	-	A/A	-	K/k	+	-	+	Klebsiella
3	Coco	+	-	-	+	-	Gama	-	-	-	K/k	-	K/k	-	+	-	Micrococcus
4	Bacilos	-	-	+	+	-	Gama	-	-	-	K/k	-	K/k	+	-	+	Aeromonas
5	Bacilos	-	-	+	+	+	Gama	-	+	-	K/A	-	K/k	-	-	+	Pseudomonas
6	Bacilos	-	+	+	+	-	Gama	-	+	-	A/A	-	K/k	+	-	+	Serratia
7	Bacilos	-	-	-	+	+	Gama	+	+	-	K/k	-	K/k	-	-	-	Corynebacterium
8	Bacilos	-	+	-	+	-	Gama	-	+	+	K/A	-	K/k	+	-	+	Citrobacter

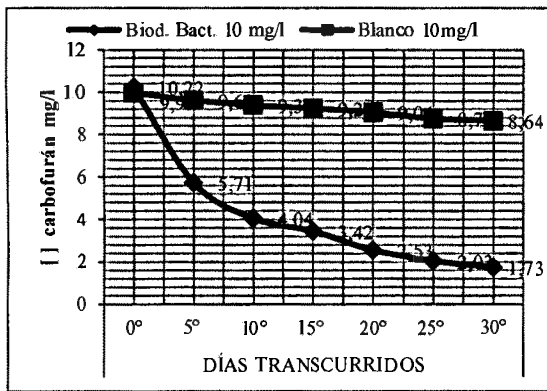


Figura 1. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 10 mg/l según días transcurridos.

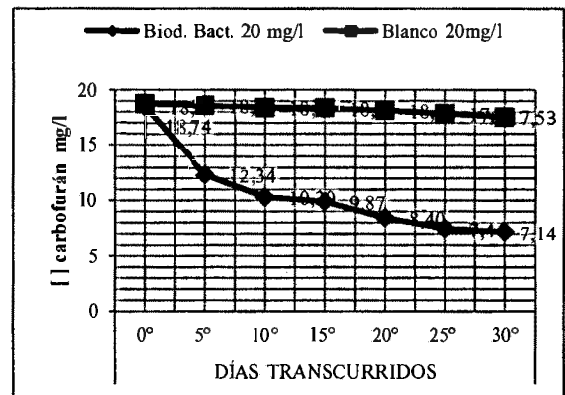


Figura 3. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 20 mg/l según días transcurridos.

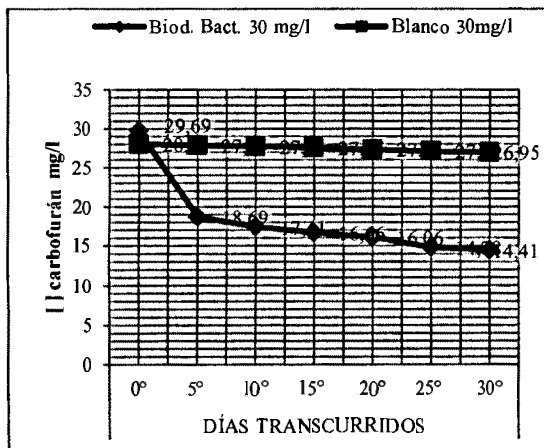


Figura 2. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 20 mg/l según días transcurridos.

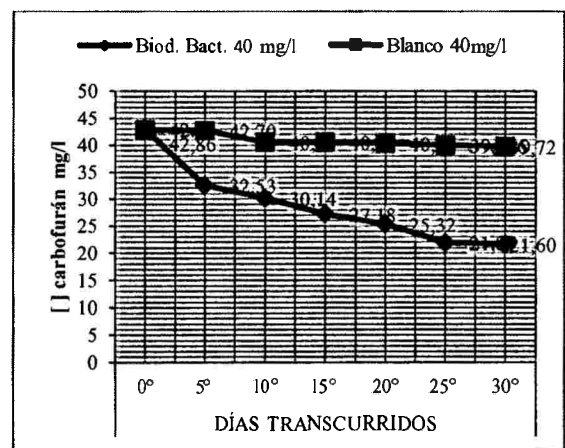


Figura 4. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 40 mg/l según días transcurridos.

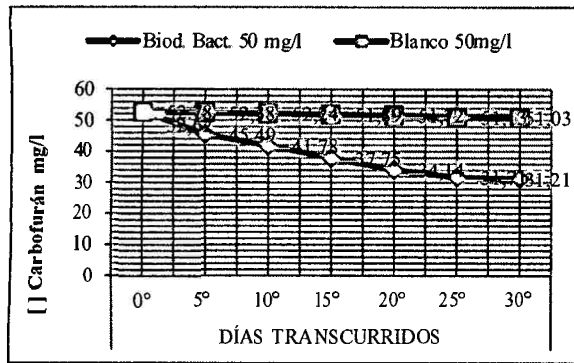


Figura 5. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 50 mg/l según días transcurridos.

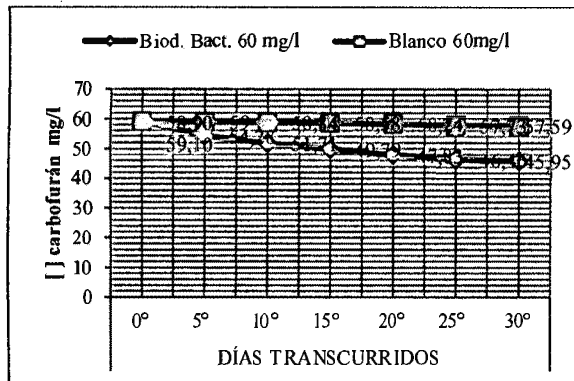


Figura 6. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 60 mg/l según días transcurridos.

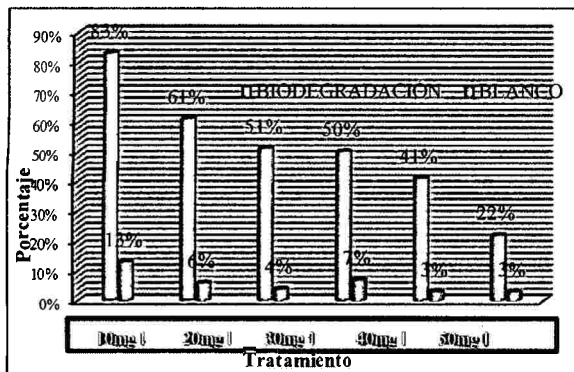


Figura 7. Porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano en relación a diferentes tratamientos.

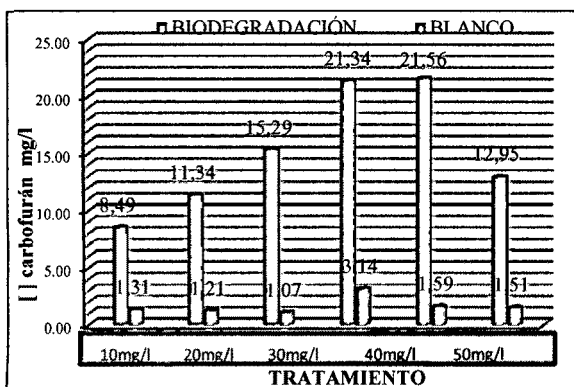


Figura 8. Cantidad total de carbofurán degradado en relación a diferentes tratamientos.

DISCUSIÓN

Ortiz-Hernández *et al.*⁵ en el año 2001 sugieren la conveniencia de buscar microorganismos degradadores de xenobióticos en sitios previamente expuestos a estos compuestos de interés para tener mayor probabilidad de éxito en los aislamientos, acorde a estas referencias, los puntos de muestreo para el presente trabajo tuvo lugar en las localidad de Chiara, donde la actividad agrícola, principalmente el cultivo de *Solanum sp.* "papa", es alto en relación a otras actividades.^{6,8} Pero también el desarrollo de estas actividades involucra el uso indispensable de diversos agroquímicos, principalmente los insecticidas (Furadán®) para el control de las diferentes plagas como es el *Premnotrypes sp.* "Gorgojo de los andes", que afecta durante la producción y almacenamiento de semillas de *Solanum sp.* "papa".⁶

Aun cuando carbofurán es extremadamente tóxico y difícil de degradar, la exposición prolongada de microorganismos a éste provoca que se genere una presión selectiva que permite generar bacterias con capacidad biodegradadora; adaptando hacia el desarrollo de enzimas capaces de actuar sobre este insecticida.⁹ Para tal efecto se ha planteado un ensayo de aislamiento de bacterias degradadoras de carbofurán a partir del suelo agrícola de la localidad de Chiara, teniendo como base el diseño planteado por Mendoza *et al.*¹⁰ en 2011 y Castrejón *et al.*¹¹ en el año 2009, tal como se muestra en la Tabla 1, donde la composición y condiciones del cultivo esta en relación a las concentraciones de carbofurán en cada uno de los ensayos del aislamiento, de tal forma que el aislamiento sea solo de bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán.⁷

En la Tabla 2 se muestra los valores del recuento de carga microbiana en los ensayos del aislamiento de bacterias capaces en desarrollar en medio Busnell Hass enriquecidos con carbofurán, realizados mediante la técnica de recuento estándar en placa a los 15 días de incubación, y a los 24 horas de proceder con el aislamiento en medio sólido (agar Busnell Hass enriquecido con carbofurán). Los detalles de los valores obtenidos nos permiten tener referencia sobre la concentración de carbofurán con la que se debe trabajar en los aislamientos en el medio sólido, de tal forma que no exista la inhibición por sustrato (carbofurán) ni mucho menos déficit en nutrientes durante el periodo de incubación; donde los valores de los ensayos BH-C5-M, BH-C10-M, BH-C20-M, BH-C30-M y BH-C40-M resultaron $6,2 \times 10^6$ UFC/ml, $8,5 \times 10^6$ UFC/ml, $8,6 \times 10^6$ UFC/ml, $8,5 \times 10^6$ UFC/ml y $8,4 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente, los cuales son mayores en relación al valor del ensayo BH-C50-M que resultó $8,4 \times 10^6$ UFC/ml; esto muestra que la concentración de carbofurán influye en el desarrollo

de las bacterias. Por lo tanto, teniendo en cuenta la toxicidad de carbofurán,¹² requerimientos nutricionales de las bacterias¹³ y el tiempo de incubación para el aislamiento en medio sólido; los ensayos BH-C20-M, BH-C30-M y BH-C30-M correspondientes a 20, 30 y 40 mg/l de carbofurán en caldo Busnell Hass, pertenecen al rango de concentración óptima de carbofurán para aislamiento, por lo que se eligió utilizar 30 mg/l de carbofurán para enriquecimiento al medio agar Busnell Hass. Mientras los valores de los ensayos BH-C30 y BH (banco negativo) fueron nulos. Pero el valor del ensayo BH-M muestra 3 UFC/ml, lo cual refleja la presencia de bacterias esporuladas en tierra agrícola¹² que permanece en este estadio durante la incubación del ensayo por razones de falta de nutrientes (fuente de carbono) hasta el momento en que el medio es óptimo para su desarrollo vegetativo que ocurre al momento de siembra en agar nutritivo.

Los resultados antes indicados nos hace suponer que el aislamiento directo en agar nutritivo permite el crecimiento tanto de bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán como las bacterias esporuladas que no tienen la capacidad biodegradadora de carbofurán. De ahí la importancia del uso de agar Busnell Hass enriquecido con 30 mg/l de carbofurán, teniendo referencia a la mayor carga microbiana del recuento estándar en placa en la Tabla 2; de tal forma que las bacterias que logren desarrollar en este medio sean efectivamente lo que presenta la capacidad para degradar carbofurán, como se muestra en el Anexo 10. Luego agrupadas según las características culturales y microscópicas (Tabla 3).

El ensayo de biodegradación en el laboratorio se realizó utilizando el consorcio bacteriano aislados de suelos agrícolas de Chiara, a la vez teniendo en cuenta la influencia de las concentraciones de carbofurán sobre la actividad biodegradadora del consorcio. En la Figura 1 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en relación al tiempo a 10 mg/l de carbofurán. Luego a medida que pasa el tiempo los valores de carbofurán en el ensayo problema iniciaron reducir hasta 1,73 mg/l de carbofurán al final del ensayo. Mientras en el ensayo blanco la reducción es mínima que llega hasta 8,64 mg/l de carbofurán. Esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 8,49 mg/l de carbofurán que equivale a 83% respecto a la concentración inicial.

En la Figura 2 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 20 mg/l de carbofurán. Luego a medida que pasa el tiempo los valores del ensayo problema es reducido como

producto de la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano, obteniendo al final del ensayo 7,13 mg/l de carbofurán mientras en el ensayo blanco 17,53 mg/l de carbofurán. Por tanto la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 11,34 mg/l de carbofurán que equivale a 61% respecto a la concentración inicial.

En la Figura 3 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 30 mg/l de carbofurán. Obteniendo al final del ensayo 14,41 mg/l de carbofurán, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 15,29 mg/l de carbofurán que equivale a 51% respecto a la concentración inicial. Mientras en el ensayo blanco 26,95 mg/l de carbofurán.

En la Figura 4 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 40 mg/l de carbofurán. Logrando reducir a los 30 días hasta 21,60 mg/l y 39,72 mg/l de carbofurán, tanto en el ensayo problema como en el ensayo blanco respectivamente. Por tanto la actividad biodegradadora del consorcio ha logrado reducir en 21,34 mg/l de carbofurán equivalentes a 50% respecto a la concentración inicial.

En la Figura 5 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 50 mg/l de carbofurán. Luego a medida que pasó el tiempo los valores del ensayo problema es reducido, obteniendo al final del ensayo 31,21 mg/l de carbofurán. Esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 21,56 mg/l de carbofurán que equivale a 41% respecto a la concentración inicial. Mientras en el ensayo blanco se redujo hasta 51,03 mg/l de carbofurán.

En la Figura 6 muestra los valores de biodegradación en el ensayo problema y valores del ensayo blanco en razón al tiempo a 60 mg/l de carbofurán, logrando reducir a los 30 días hasta 45,95 mg/l y 57,52 mg/l de carbofurán, tanto en el ensayo problema como en el ensayo blanco respectivamente. Significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano ha logrado reducir 12,95 mg/l de carbofurán que equivale a 22% respecto a la concentración inicial.

Tal como se muestra los resultados en la Figura 1 hasta la Figura 6; en los ensayos blanco negativo hay una cierta disminución de los valores de carbofurán respecto a la concentración inicial, lo que significa que la degradación no es exclusiva por fenómenos bióticos. Jones y Norris¹⁴ plantean que el primer proceso de degradación del carbofurán es

por hidrólisis ya sea química, física o microbiano. Ajona y Vidal¹⁵ también describen que la degradación fisicoquímica dado por el proceso fotocatalisis solar y la volatilización son las principales vías de degradación del carbofurán. Mientras Stoorvogel *et al.*¹⁶ en el año 2003 hacen la referencia sobre los procesos químicos de óxido-reducción de plaguicidas en el medio ambiente. En base a estas referencias planteamos que la causa de la reducción de carbofurán en los ensayos blancos, se debe a procesos abióticos. Teniendo como base a estas referencias el ensayo se realizó en un ambiente fuera del alcance de la luz solar y artificial de tal forma que la desintegración fotocatalítica es inhibida.

Con respecto a los cuadros anteriormente señalados de biodegradación, la reducción significativa de los niveles de carbofurán ocurrió en los diez primeros días de incubación, luego se hace menos notorio. Los procesos bioquímicos son dependientes de la concentración de xenobióticos. El valor de biodegradación son significativos cuando el consorcio bacteriano aisladas de una zona de constante aplicación del mismo producto o similares. Mientras en la Figura 6 (tratamiento con 60 mg/l de carbofurán) no ha mostrado una actividad biodegradadora significativa como tal en los tratamientos de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l, lo que significa que debe tener un gran cuidado con los microorganismos usados en altas concentraciones de pesticidas, ya que pueden ser inhibidos o causar su muerte por los efectos tóxicos de estos contaminantes.⁴

La Figura 1 muestra los valores de biodegradación en mg/l en relación a las diferentes concentraciones de carbofurán, hace notorio la variación de la actividad biodegradadora dada a diferentes concentraciones de carbofurán. Lo cual ha sido contrastada al realizar análisis de varianza con los datos obtenidos en cada uno de los tratamientos (nivel de confianza al 95%). En los tratamientos con 30, 40 y 50 mg/l son los que mayor degradación se ha obtenido, es decir, el consorcio bacteriano presentes en dichos son los mayores responsables en la biodegradación de carbofurán durante los 30 días del ensayo, lo que no ocurrió en los tratamientos con 10 y 30 mg/l que por la baja dosificación de carbofurán hace que no haya interacción microorganismos sustrato que conlleva no activación de enzimas degradadoras. Mientras en el tratamiento 60 mg/l de carbofurán la actividad tóxica de esta insecticida no permitió un adecuado biodegradación.

Por tanto la biodegradación del carbofurán también depende múltiples factores como: condiciones ambientales abióticas (temperatura, humedad, pH, nutrientes, etc.), comunidad microbiana (especie y

la relación entre ellos), características insecticidas (tipo y concentración) y reacciones biológicas y fisicoquímicas tal como reportan Ortiz-Hernández *et al.*⁵ Teniendo consideración estos factores durante el ensayo de biodegradación, la temperatura fue acondicionada a 30 °C, el pH semejante a sitios de muestreo que fue cinco, ligeramente ácido (pH=5,5) y las concentraciones de variante de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/l de carbofurán.

Luego del ensayo de biodegradación realizados en laboratorio y logrado la recuperación del consorcio bacteriano con capacidad biodegradadora utilizando agar Busnell Hass enriquecido con 30 mg/l de carbofurán y agar nutritivos como medio de purificación; se obtuvieron 18 cepas puras de acuerdo a las características culturales y coloración Gram como muestra en la Tabla 3. Luego teniendo en cuenta las características culturales y microscópicas prosiguieron a identificar mediante las pruebas bioquímicas tal como muestra la Tabla 4: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Citrobacter* y dos cepas no identificadas. Los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium* y *Aeromonas* son reportadas como bacterias de interés ambiental que degradar diferentes xenobióticos.^{7,8,9} Madigan *et al.*¹³ en año 2013 hacen referencia sobre el género *Klebsiella* como bacteria degradadora de pesticidas, mientras que los géneros *Serratia*, *Proteus*, *Micrococcus* y *Citrobacter* no hay reportes como bacterias degradadoras de pesticidas (carbofurán).

CONCLUSIONES

- 1.El consorcio de bacterias con capacidad biodegradadora de carbofurán, aisladas de suelos agrícolas de Chiara están conformadas por los géneros: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Citrobacter* y dos cepas no identificadas.
- 2.La actividad biodegradadora de carbofurán realizada por el consorcio bacteriano muestra una capacidad de remoción hasta del 83% respecto a la concentración inicial; desarrollado bajo condiciones de laboratorio a 30 °C en constante agitación en medio mineral Busnell Hass durante 30 días.
- 3.La actividad biodegradadora del consorcio bacteriano está influenciada por la concentración de carbofurán, logrando remover mayor cantidad de pesticidas a las concentraciones iniciales de 30 y 40 mg/l de carbofurán.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Badii M, Garza V. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. CULCy//Impacto Ecológico [revista en Internet] 2007 enero-febrero. [acceso 19 de octubre de 2012]; 4(18): 9-25. Disponible en: <http://www2.uacj.mx/IIT/CULCYT/Enero-Febrero2007/5ARTCULOBADIIPDF>
2. Murugesan A, Jeyasanthi T, Maheswari S. Isolation and characterization of cypermethrin utilizing bacteria from Brinjal cultivated soil. African Journal of Microbiology Research [revista on-line] 2010 enero. [Acceso 30 de agosto de 2012]; 4(1): 10-13. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/ajmr>
3. Mostafa Gamal AE. Electrochemical biosensors for the detection of pesticides. The open electrochemistry journal [revista en internet] 2010 marzo-junio. [acceso 19 de octubre de 2012]; 2(1): 22-42. Disponible en : <http://www.benthamscience.com/open/toelecj/articles/V002/22TOELECJ.pdf>
4. Beshay U, Haleem D, Abd A, Moawad H, Zaki S. Phenol biodegradation by free and immobilized Acinetobacter. African Journal of Biotechnology [revista en Internet] 2002 enero. [acceso 20 de octubre de 2012]; 2(1): 8-12. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/AJB>
5. Ortiz-Hernández L, Monterrosas M, Yañes G, Sánchez E. Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. Rev. Int. Contam. Amb. [revista en internet] 2001 enero-junio. [acceso 3 de noviembre de 2012]; 17(3): 147-155. Disponible en: <http://132.247.146.34/index.php/rica/article/view/25524>
6. Dirección Regional de Agricultura. Informe técnico final de producción agraria y Económica Regional de Ayacucho. Perú: Gerencia de Desarrollo Económico. 2012.
7. Servicio Nacional de Sanidad Agraria Perú (SENASA). Informe técnico general de actividades anuales. SENASA Vegetal. Ayacucho. 2012.
8. Gobierno Regional de Ayacucho, Proyecto de Zonificación Ecológica y Económica (G.R.A.-ZEE). Perú: Informe técnico final del Proyecto de Zonificación Ecológica y Económica Regional. Gerencia de Desarrollo Económico: Subgerencia de Medio Ambiente; 2012.
9. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. AA. 1226, Medellín, Colombia. Docente Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 2009.
10. Mendoza J, Perea Y, Jaime S, Janette A, Pérez G. Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. ACI [revista en internet] 201 labril mayo, [acceso 3 de octubre de 2012]; 2(3): 45-55. Disponible en: http://www.erevistas.csic.es/ficha_articulo.php?url=oai-revista581:58&oai-iden=oai-revista581
11. Castrejón M, Sánchez E, Ortiz L. Caracterización e identificación de consorcios bacterianos capaces de crecer sobre plaguicidas organofosforados. [monografía en internet]. Mexico: Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2009 [acceso 19 de noviembre de 2012]. Disponible en: <http://www.uaemex.mx/Red-Ambientales/docs/memorias/Extenso/CA/EC/CAC-04.pdf>
12. Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores de New Jersey (DESAPEM). Hoja Informativa sobre Sustancias Peligrosas. Estados Unidos. 2005.
13. Madigan M, Martinko J, Parker J, Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid: Prentice Hall Iberia. 2003. p. 978-990.
14. Jones R, Norris F. Factors affecting degradation of aldicarb and ethoprop. Journal of Nematology [revista en internet] 1998 diciembre. [acceso 21 de noviembre de 2012]; 30(1): 45-55. Disponible en: <http://www.musalit.org/pdf/IN050654-es.pdf>
15. A jona J, Vidal A, The use of CPC collectors for detoxification of contaminated water solar energy: Design, construction and preliminary results. Solar Energy [revista en internet] 2000 enero, [eccesso 28 de agosto de 2012]; 68(1): 109-120. Disponible en: <http://www.researchgate.net/publication/222140368-The-use-of-CPC-collectors-for-detoxification-of-contaminated-water-Design-construction-and-preliminary-results>
16. Stoorvogel J, Jaramillo R, Merino R, Kosten S. Plaguicidas en el Medio Ambiente. Natural Resource Management [revista en internet] 2003 [acceso 12 de noviembre de 2012]; 67(2): 49-69. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S036528072007000200002&script=sci-arttext&tlng=pt>