

**BIODEGRADACIÓN DE CARBARIL POR *Sphingobium* sp., S8-M3-13 EN
CONDICIONES *in vitro*.**

JAQUELINE ARLETH GALVIS LÓPEZ

**UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
TUNJA
2015**

**BIODEGRADACIÓN DE CARBARIL POR *Sphingobium* sp., S8-M3-13 EN
CONDICIONES *in vitro*.**

JAQUELINE ARLETH GALVIS LÓPEZ

**Trabajo presentado como requisito parcial para optar el título de Magister en
Ciencias Biológicas**

Director

JOSE CASTELLANOS ROZO

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

TUNJA

2015

NOTA DE ACEPTACIÓN

Según el acta de sustentación N° _____ para JAQUELINE ARLETH GALVIS LÓPEZ, fue aprobada y calificada esta tesis de Maestría como _____, por la Escuela de POSGRADOS DE LA Facultad de Ciencias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

GABRIEL PATARROYO MORENO
Decano Facultad de Ciencias

JOVANNY A. GOMEZ
Director Escuela de Posgrados

OSWALDO ELIECER CARDENAS
Jurado Calificador

MAYRA BELTRAN P.
Jurado Calificador

JAIRO A. CAMACHO
Coordinador Académico
Maestría en Ciencias Biológicas

JOSE CASTELLANOS R
Director de Tesis

JAQUELINE ARLETH GALVIS LÓPEZ
Est. Maestría en Ciencias Biológicas

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres, quienes son y serán siempre apoyo en mi formación académica y personal.

A mi director Jose Castellanos Rozo, por su apoyo, colaboración, asesoría, consejos y valiosa confianza que han hecho realidad este proyecto.

También agradezco a mi compañera y amiga Elsitá Manjarres quien me escucho y aconsejo en todo este proceso y en gran parte de mi formación académica.

También agradezco a mi compañero y amigo Wilfred Espinosa quien me escucho y aconsejo en todo este proceso.

Agradezco igualmente a Fredy Cardénas por su colaboración y ayuda en este proceso.

CONTENIDO

	pág
INTRODUCCIÓN	9
CAPITULO 1. Marco conceptual	10
1.1. Plaguicidas	10
1.2. Clasificación de Plaguicidas	11
1.3. N-Metil-Carbamatos	12
1.4. Carbaril	12
1.4.1. Características Físicoquímicas	12
1.4.2. Destino Ambiental	13
1.4.2.1. Degradación Abiótica	13
1.4.2.2. Degradación Biótica	15
1.5. Justificación	22
1.6. Objetivos	25
1.6.1. Objetivo	25
1.6.2. Objetivos Específicos	25
CAPITULO 2. Materiales y Métodos	26
2.1. Cultivo de la bacteria	26
2.2. Identificación de la bacteria por DNAr 16s	27
2.3. Método espectrofotométrico	28
2.3.1. Biodegradación de carbaril por método espectrofotométrico	30
2.4. Método Cromatografico (HPLC-UV)	31

2.4.1. Biodegradación de carbaril por el método cromatográfico	33
2.4.2. Biodegradación de 1-naftol por el método cromatográfico	34
CAPITULO 3. Resultados y Discusión	35
3.1. Cultivo de la bacteria	35
3.2. Identificación de la bacteria por DNAr 16s	35
3.3. Método espectrofotométrico	37
3.3.1. Biodegradación de carbaril por el método espectrofotométrico	40
3.4. Método Cromatográfico (HPLC-UV)	42
3.4.1. Biodegradación de carbaril por el método cromatográfico	44
3.4.2. Biodegradación de 1-naftol por el método cromatográfico	45
4. CONCLUSIONES	48
5. BIBLIOGRAFIA	49
6. ANEXOS	60

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Estructura química del plaguicida carbaril (N-Meticarbamato).	13
Figura 2. Ruta de degradación de carbaril propuesta para <i>Pseudomonas</i> sp. C4, C5 y C6, <i>Microoccus</i> sp., y <i>Arthrobacter</i> spp	20
Figura 3. Reacción de diazotización para carbaril.	28
Figura 4. Análisis filogenético del aislamiento S8-M3-13 y de especies relacionadas.	36
Figura 5. Curva de calibración para la determinación de carbaril mediante la técnica colorimétrica	38
Figura 6. Biodegradación de carbaril utilizando método espectrofotométrico y crecimiento microbiano	40
Figura 7. Cromatograma típico de los extractos de cultivo obtenidos de <i>Sphingobium</i> sp., S8-M3-13.	42
Figura 8. Curva de calibración para la determinación simultánea de carbaril y 1-naftol mediante cromatografía líquida de alta eficiencia o alta resolución (HPLC-UV).	43
Figura 9. Biodegradación de de carbaril y 1-naftol utilizando el método (HPLC-UV) y Crecimiento microbiano.	45

LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su composición química	11
Tabla 2. Combinaciones de concentraciones de carbaril y 1-naftol utilizadas para la curva de calibración	32
Tabla 3. Ensayo intradia para concentraciones de carbaril	38
Tabla 4. Ensayo interdia para concentraciones de carbaril	39
Tabla 5. Ensayo de recuperación de carbaril con Cloroformo	39
Tabla 6. Ensayo de recuperación de 1-naftol con Cloroformo	44
Tabla 7. Degradación de 1-naftol y crecimiento microbiano.	46

INTRODUCCIÓN

El carbaril es uno de los plaguicidas N-metilcarbamatos ampliamente utilizado por ser eficaz en el control de plagas, ha sido prohibido en Europa y Estados Unidos, debido a la toxicidad del compuesto parental y de sus productos de degradación, sin embargo aún es ampliamente empleado en América Latina donde su uso es frecuente en diferentes cultivos, especialmente en el cultivo de la papa (Bonner *et al.*, 2005). En Colombia, específicamente en el departamento de Boyacá el cultivo de papa *Solanum tuberosum* es considerado como el cultivo con mayor uso de agroquímicos y el primer cultivo con mayor demanda y aplicación de plaguicidas (Instituto Nacional de Salud, 2011). Se ha determinado que los plaguicidas de mayor uso son los derivados de ácido carbámico entre los que se encuentran el carbaril, aplicado extensivamente en la formulación comercial Sevin®, para controlar principalmente el Pilme de la papa (*Epicauta pilme*) y el Bicho bolita (*Armadillidium vulgare*), causantes de grandes pérdidas en este cultivo (Rodríguez, 1996). El carbaril (1-naftil N-metilcarbamato) es un plaguicida que inhibe la acción de la enzima acetilcolinesterasa, provocando disfunción del sistema reproductivo y endocrino. Por otra parte podrían influir en la proliferación celular de muchos procesos cancerosos (Moreno, 2002). Debido a esta problemática, a nivel mundial se han formulado diferentes estrategias para disminuir el impacto que tienen los plaguicidas en el medio ambiente y la salud humana.

Una de las estrategias que tiene un potencial importante es la biorremediación, la cual se fundamenta en la capacidad que tienen algunos organismos vivos para transformar y mineralizar compuestos de difícil degradación siendo una herramienta efectiva para mejorar la degradación de contaminantes en el medio ambiente (Atrevi *et al.*, 2002).

A nivel mundial se han aislado y caracterizado bacterias capaces de degradar plaguicidas entre ellas la especie bacteriana reportada como *Sphingomonas* sp., este microorganismo mostró que además de degradar el plaguicida N-metilcarbamato carbofuran, posee también la capacidad para degradar carbaril, Propoxur, Aldicarb, Gentsato y Acido Procatecoico. (Feng *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Castellanos *et al.*, 2013a).

Estudios realizados en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), permitieron aislar de suelos del municipio de Silos Norte de Santander, bacterias con características fisiológicas similares a *Sphingomonas* sp., estas fueron capaces de degradar el plaguicida carbofuran como única fuente de carbono y/o nitrógeno respectivamente (Castellanos *et al.*, 2013a). Estos suelos fueron cultivados con papa con un historial de aplicación de 8 años de plaguicidas, dentro de ellos y como el más representativo el carbofuran. Se pudo determinar en este estudio que las cepas caracterizadas morfológica y fisiológicamente como *Sphingomonas* sp., degradaron el carbofuran y su metabolito primario 7-fenol como fuente de carbono y/o nitrógeno. El objetivo de esta investigación es determinar si la cepa S8-M3-13 que tiene la capacidad de degradar carbofuran y 7 fenol es capaz de degradar carbaril en condiciones *in vitro*.

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1 PLAGUICIDAS

Por definición un plaguicida es una sustancia química orgánica o inorgánica, de origen natural o sintético; que se utiliza para combatir, destruir mitigar o repeler: virus, bacterias, hongos, nemátodos, ácaros, moluscos, insectos, plantas no deseadas, entre otros: con el fin de proteger los cultivos o restringir la transmisión de enfermedades en humanos (Gilpin, 1996).

Desde el punto de vista de la salud, los plaguicidas son diseñados para eliminar organismos obstruyendo mecanismos metabólicos vitales, teniendo en cuenta que las principales rutas metabólicas son comunes en la mayoría de los organismos, suponen un riesgo importante para la salud actualmente su uso está muy extendido, según la Agencia de Protección Ambiental (EPA) actualmente existen más de 865 plaguicidas registrados, cifra que tiende a incrementarse por lo que su erradicación o sustitución parece una difícil tarea; más aún, se hace imposible pensar que exista algún ser humano que durante su vida no haya tenido contacto con al menos, un plaguicida (Solbio, 2006).

1.2. CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS

Los plaguicidas se pueden clasificar teniendo en cuenta sus características, entre las que encontramos: estructura, biodegradación, bioacumulación y acción (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su composición química

Tipo	Estructura	Biodegradación	Bioacumulación	Acción	Ejemplos
Organoclorados	Hidrocarburos cíclicos de origen sintético	Baja	Si	Insecticida	Lindano, DDT, Endosulfan, Aldrin, Endrin, Dieldrin, Heptacloro, Toxofeno
Organofosforados	Esteres del ácido fosfóricos y sus homólogos	Alta	No	Insecticida	Clorpirifos, (Dursbán), Fenitrotion, Malation, Metilparation, Ronnel, Temefox, Triclorfon, Demeton, Palation.
Carbamatos	Derivados del ácido carbámico	Alta	No	Herbicida, fungicida e insecticida	Aldicarb (Temik), Carbofuran, Metomil, Propoxur (Baygón)
Piretroides	De origen sintético similares a las piretrinas vegetales	Alta	No	Insecticida	Resimetria, Aletrina, Decametrina, Permetrina, Fenvalerato.
Triazinas	Anillo heterocíclico, análogo al anillo del benceno.	Alta	No	Herbicida	Atrazina, Ametrina, Desmetrina, Simazina.

Fuente: Castro, 2003; Guerrero, 2003. Adaptado por los autores.

1.3. N-METILCARBAMATOS

Los plaguicidas N-metilcarbamatos son derivados del ácido carbámico, entre los N-metilcarbamatos más utilizados a nivel mundial se encuentran: carbofuran (2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofuran-7-hidroxi metilcarbamato), carbaril (1-naftil metilcarbamato), aldicarb (2-metil-2-(metiltio) propanal O-(N-metilcarbamoil) oxima) (Nogueira *et al.*, 2003, Naqvi *et al.*, 2009, Dong *et al.*, 2012), fenoxicarb (etil N-(2-(4-fenoxifenoxi)etil) carbamato), fenobucarb (2-Butan-2-ilfenil) N-metilcarbamato) (Dong *et al.*, 2012), metomil (Smetil- N-(metilcarbamoil-oxi)-tioacetimidato), pirimicard (2-dimetilamino-5,6-dimetilpirimidin-4-il) dimetilcarbamato), carbosulfan (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il (dibutilaminotio) metilcarbamato), oxamil (N,N-dimetil-2-metilcarbamoil oximino-2-(metilito) acetamida) (Nogueira *et al.*, 2003), bendiocarb (2,2-dimetil-1,3 -benzodioxol-4-il-metilcarbamato) y propoxur (2-isopropoxifenil N-metilcarbamato) (Topp *et al.*, 1993) (citado en Castellanos *et al.*, 2013b).

1.4. CARBARIL

1.4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

El carbaril (1-naftil N-metilcarbamato) es un plaguicida perteneciente al grupo de los N-metilcarbamatos, con fórmula molecular $C_{12}H_{11}NO_2$, es un insecticida de amplio espectro que se utiliza para el control de plagas en granos de cereales, legumbres, pasturas, árboles forestales, aves de corral y ganado (IPCS, 1994; Agriculture and Agri-Food Canada, 1997) (figura 1).

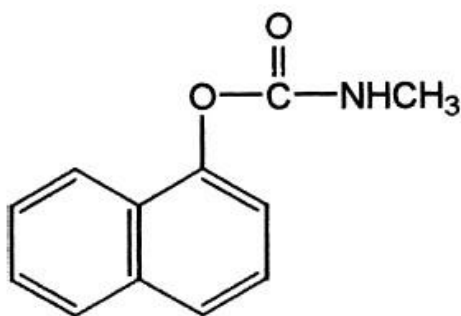


Figura 1. Estructura química del Carbaril (1-naftil N-metilcarbamato).

Fuente: Doddamani y Ninnekar, 2001.

Carbaril se considera como un sólido cuyo peso molecular es de 201.20 g/mol, su punto de fusión es de 142°C y maneja una presión de vapor de 0.041 mPa a 23.5 °C. Su solubilidad en agua es 120 mg/L a 20°C, es moderadamente soluble en disolventes orgánicos polares como la DMF(*N,N*-dimetilformamida), el dimetilsulfóxido y la acetona, en otros disolventes carece de solubilidad como es el caso del hexano y del benceno.

El doctor Lambrech lo sintetiza por primera vez en 1953 y lo introduce como plaguicida agrícola en el año de 1958, desde entonces es uno de los plaguicidas más utilizados en el mundo contra plagas de cultivos de frutas, verduras, cereales, bosques de madera, algodón e insectos de animales domésticos y del ganado (Back, 1965; Kaufman, 1967) esto hace que el carbaril sea un plaguicida de amplio espectro que se utiliza para el control de diversas plagas (IPCS, 1994; Agriculture and Agri-FoodCanada, 1997).

1.4.2 DESTINO AMBIENTAL

1.4.2.1. DEGRADACIÓN ABIÓTICA

El carbaril es el segundo insecticida detectado en aguas superficiales en los Estados Unidos (Martin *et al.*, 2003). Condiciones de temperatura, pH, anoxia y alto contenido de materia orgánica en los sedimentos, tienen una incidencia directa en la velocidad de degradación del

carbaril en el medio acuático (Hanazato y Yasuno, 1989; Lartigues y Garrigues, 1995). En aguas con un pH alcalino y a 20 °C el carbaril se hidroliza rápidamente a 1-naftol, metilamina y dióxido de carbono alcanzando una tasa de descomposición del orden del 20 % por día (Stewart *et al.*, 1967). En un cuerpo de agua cuyo pH fluctúa entre 7.0 y 7.4, la vida media de este plaguicida es de 10.5 días; sin embargo, a pH 8,0 su degradación es de 1.8 días (Aly y El-Dib; 1971). En condiciones de neutralidad el tiempo de vida media en la columna de agua es de 10 días (Howard, 1991). Sin embargo, otro estudio demostró que la vida media de la degradación en el agua podría extenderse hasta cuatro años a escalas de pH de 5 (Larkin y Day, 1986).

La degradación de los residuos de plaguicidas en el suelo depende en gran parte del comportamiento físico-químico del plaguicida, de las propiedades de los pesticidas, de la especificidad de los químicos, además del tipo de suelo como carácter fundamental en el proceso de degradación. En suelos básicos se ha reportado que el carbaril se hidroliza produciendo 1-naftol como el principal producto de su degradación (Moreno, 2002; Durkin y King, 2008; Venkateswarlu *et al.*, 1980; Rajagopal *et al.*, 1983; Gunasekara *et al.*, 2008).

Se ha observado que la degradación del carbaril en el suelo podría darse también por reacciones de oxidación y fotólisis cuando este se encuentra en la superficie del suelo. (Larkin y Day, 1986; Bollag y Liu, 1971; Rajagopal *et al.*, 1984; Ramanand *et al.*, 1988; Sudy *et al.*, 1972).

Otros estudios realizados con carbaril marcado radiactivamente en diferentes tipos de suelo determinaron tasas de mineralización que variaron de 3.0 a 37.4% durante el período de incubación de 32 días, sin embargo se evidencia como principal vía de degradación la hidrólisis produciendo 1-naftol y metilamina (Kazano *et al.*, 1972).

Estudios realizados por Johnson y Stansbury en el año 1965, encontraron que a tres concentraciones diferentes de carbaril, en un suelo franco arenoso, la vida media de este compuesto es de ocho días, en todos los casos los residuos desaparecieron a los 40 días.

(Kazano *et al.*, 1972). No obstante Ahmad y colaboradores en el 2004, investigaron la biodisponibilidad y biodegradación de carbaril en un suelo con una larga historia de aplicación en Mamoon Kanjan, Pakistán, sus resultados demostraron que el carbaril persiste en el suelo sin tener aún un estimativo de porcentaje del mismo.

Por otro lado un experimento de campo a gran escala manejado con un diseño de bloques completos al azar, se realizó para estudiar la degradación de carbaril en el suelo, el suelo se trató con diferentes tratamientos basados en suministro de nutrientes, la degradación se observa en dos niveles de suelo después de 7, 14 y 21 días respectivamente encontrando que las bacterias del suelo se alimentan de la adición de nutrientes estimulando la biodegradación de carbaril considerablemente y que con el transcurrir del tiempo aumenta, a los 21 días se registra un nivel alto de degradación oscilando entre 85% y 89%, utilizando una fuente de nitrógeno (Naquvi *et al.*, 2011).

1.4.2.2. DEGRADACIÓN BIÓTICA

Varios estudios demuestran que el carbaril puede inducir toxicidad en los seres humanos, mamíferos, animales y aves por contacto dérmico, así como las vías respiratorias y digestivas, actualmente este plaguicida se encuentra clasificado por la EPA como un tóxico por vía oral moderada con Categoría II (Cranmer, 1986).

A nivel del ser humano, sea comprobado que al entrar en contacto con el carbaril, además de inhibir la acetilcolinesterasa, también puede provocar disfunción del sistema reproductivo y endocrino. También se ha comprobado que podrían influir en la proliferación celular de procesos cancerosos, no obstante, los N-metilcarbamatos no son mutagénicos (Moreno, 2002).

Este tipo de plaguicida se absorbe por inhalación, ingestión y vía tópica en mamíferos, aves, insectos y plantas. En los mamíferos las principales rutas para su metabolización son la hidroxilación y la hidrólisis del anillo, generando con ello numerosos metabolitos que sufren

conjugaciones que dan lugar a sulfatos, lucorónidos y compuestos mercapturados que llegan a ser solubles y que son eliminados en la orina (CASAFE, 1995).

En los animales, los niveles más altos de carbaril y su principal metabolito 1-naftol se encuentran en el riñón, sangre, hígado, y cerebro; el producto de oxidación es N-hidroximetilcarbaril, el cual se detecta en el cerebro de los animales (Koshlukova y Reed, 2014), La DL₅₀ oral aguda es de 108-840 mg/Kg para ratas, ratones, conejos, cobayas, perros, gatos y ciervos (Jorsaraei *et al.*, 2014).

Es altamente tóxico para invertebrados marinos y otras especies acuáticas entre las dosis de mayor impacto se encuentran: La DL₅₀ para las especies de camarón de 5.7 ppb, la CL₅₀ para *Daphnia magna* que va desde 1.7 hasta 26 ppb, la CL₅₀ aguda para los peces varía ampliamente, por ejemplo en escalas de 0.25 a 0.69 ppm para el salmón del Atlántico, la trucha de lago (Arcoirs) de 1.2 a 20 ppm (Koshlukova y Reed, 2014).

Numerosos reportes de muertes de aves son documentadas por ingestión directa e indirecta de carbaril en los campos con contenidos de aplicación de carbaril, algunos reportes de aves registran toxicidad aguda que varía entre especies, la DL₅₀ para el faisán (pato) que es de 707 mg/kg y de 2500 mg/kg para el pato ánade real. La toxicidad crónica repercute en la capacidad reproductiva, incluyendo disminución del número de huevos y fertilidad baja (Koshlukova y Reed, 2014). El carbaril es altamente tóxico para las abejas de miel con una LD₅₀ aguda de 1 ppb, para la lombriz de tierra (*Lumbricus herculeus*) es particularmente susceptible con un valor CL₅₀ en suelo de 0.5 ppm a 5 horas. Es probable que la mortalidad de lombrices pueda producir un incremento de envenenamiento secundario en muchas especies (Eisler, 1985).

Se ha comprobado experimentalmente que algunos microorganismos al estar expuestos continuamente a este tipo de compuestos, han adquirido la capacidad de metabolizarlos como única fuente de carbono y/o nitrógeno hasta la mineralización completa, es decir el producto final de la transformación es CO₂ y agua. También se ha evidenciado que repetidas

aplicaciones de carbaril en el suelo, pueden resultar en tasas de degradación aceleradas debido a procesos microbianos, esto se ha logrado evidenciar con tan solo dos aplicaciones. (Harris *et al.*, 1984; Turco y Konopka, 1990; Scow *et al.*, 1990; Felsot *et al.*, 1981; Getzin y Shanks, 1990).

Ensayos hechos por Parekh y colaboradores en 1994, determinaron que cuando los suelos son tratados con cloranfenicol, un antibiótico de amplio espectro, se reduce la tasa de degradación de carbofuran y carbaril con respecto a suelos no tratados, lo cual indica que las bacterias en el suelo son las principales responsables de la degradación de los plaguicidas (Parkin y Shelton, 1994).

La degradación de carbaril por bacterias fue descrita por primera vez por Bollag y Liu, 1971; Sudy *et al.*, 1972), quienes reportaron una cepa bacteriana llamada *Achromobacter* sp. A partir de entonces, se han reportado diferentes bacterias que degradan carbaril con la utilización del mismo como fuente de carbono y /o nitrógeno para su crecimiento, entre ellas: *Pseudomonas* sp. 12043, *Rhodococcus* sp. 12038 (Larkin y Day, 1986), *Bacillus* sp. (Rajagopal *et al.*, 1984), *Pseudomonas* sp. 50552 y 50581 (Chapalamadugu y Chaudhry, 1991), *Blastobacter* sp. M501 (Hayatsu y Nagata, 1993) y *Arthrobacter* sp. RC100 (Hayatsu *et al.*, 1999), *Rhizobium* sp., (Hashimoto *et al.*, 2002), *Agrobacterium* sp., y *Achromobacter* sp., (Karns y Tomasek, 1991), *Aminobacter ciceronei* nov. ER2 (Topp *et al.*, 1993), *Sphingomonas* sp., CF06 (Ogram *et al.*, 2000).

Se ha reportado ampliamente que la hidrólisis enzimática del enlace metilcarbamato es el mecanismo primario de inactivación del carbaril en el ambiente. La hidrólisis del enlace carbamato podría ocurrir por cualquiera de las dos vías, por rompimiento del enlace éster (el grupo carbonilo del ácido N-metilcarbámico unido al fenol) o por rompimiento del enlace amida. En ambos casos tanto con la amidasa o con la esterasa, el producto de la hidrólisis es idéntico, dada la inestabilidad del enlace del ácido N-metilcarbamato produciendo 1-naftol y metilamina. Se ha comprobado que el metabolito 1-naftol es más tóxico que el compuesto parental (carbaril) y que hay bacterias que no lo degradan sino que

producen 1-naftol y viven a partir de metilamina como única fuente de carbono y nitrógeno (Castellanos y Rache, 2013b) (Figura 2a).

Sin embargo, se han descrito bacterias involucradas en la degradación completa de la estructura del anillo aromático del carbaril, que involucran la degradación del metabolito intermediario 1-naftol. Sato *et al.*, (1999), reportó dos nuevas cepas bacterianas que degradan rápidamente carbaril, estos aislamientos son especies de *Arthrobacter* que fueron designadas como 19B y 19C basados en el contenido de guaninas y citosinas, la composición de ácidos grasos, la presencia de menaquinona isopregnenolona y el análisis del gen 16S rRNA, la cepa 19B degradó completamente 50 mg/L/día de carbaril en medio mínimo de sales minerales, del mismo modo, la cepa 19C mostró capacidad de degradación. Análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas evidenciaron que el principal producto de la degradación de carbaril es el metabolito 1-naftol, el cual se transforma en los metabolitos secundarios: 1,4-naftalenodiona y 1,4-naftalenodiol, lo que sugiere una misma vía de degradación de carbaril por ambas cepas (Figura 2b).

En trabajos en los que se estudiaron los aislamientos de *Pseudomonas* sp. 12043 y *Rhodococcus* sp. 12038, se demostró que estas bacterias crecían en presencia de carbaril utilizándolo como fuente de carbono y nitrógeno. Aunque las tasas de degradación de carbaril fueron lentas, ambas cepas utilizaron 1-naftol como única fuente de carbono. Los aislamientos bacterianos *Pseudomonas* sp. 12043 y *Rhodococcus* sp. 12038, fueron capaces de metabolizar 1-naftol produciendo ácido salicílico y ácido gentísico (Larkin y Day, 1986), (Figura 2d).

Estudios realizados por Doddamani y Ninnekar en el 2001, aislaron e identificaron una especie de *Micrococcus* sp. a partir de suelos contaminados con carbaril por la técnica de cultivo enriquecido en medio mineral Seubert, con carbaril (0.2% p/v) como única fuente de carbono y un pH de 6.8, esta especie fue capaz de utilizar N-metilcarbamatos entre ellos carbaril, carbofuran, naftaleno y 1-naftol como única fuente de carbono, además de utilizar otros compuestos aromáticos como sustratos de crecimiento, también se presenta degradación

de carbaril por hidrólisis generando los intermediarios metabólicos 1-naftol y metilamina, el 1-naftol logra su metabolización a través de salicilato por una vía gentisato (Figura 2c).

Swetha y Phale (2005), estudiaron tres cepas de *Pseudomonas* sp. C4, C5, y C6 que utilizaron carbaril como fuente de carbono, el objetivo fue determinar la ruta catabólica y su regulación en la degradación de carbaril, para ello las cepas aisladas del suelo contaminado con carbaril, se cultivaron en un medio mínimo de sales en un agitador rotatorio a 200 rpm, el crecimiento bacteriano fue medido por espectrofotometría a 540 nm, para aislar e identificar metabolitos, el medio se acidificó a pH 2, los metabolitos se identificaron por comparación de las propiedades de fluorescencia, distancia recorrida (RF), ultravioleta (UV) y fueron purificados y evaluados por las técnicas de espectrofotometría de masas y cromatografía de gases. Se reporta así que 1-naftol hidroxilasa y 1,2 dihidroxinaftaleno-(1,2-DHN) dioxigenasa tienen actividades en los extractos celulares y los patrones de inducción de enzimas clave, además se propone a 1,2-dihidro-droxinaftaleno como intermedio metabólico en la degradación de carbaril y al 1-naftol hidroxilasa como metabolito presente en las fracciones citosólicas, que requiere NADH y FADH, la cual tiene una actividad óptima en el intervalo de pH 7.5 a 8.0. Basados en estos resultados, la vía metabólica propuesta para la degradación de carbaril es 1-naftol - 1,2-dihidroxinaftaleno - salicilaldehído - salicilato - gentisato - maleilpiruvato (Figura 2c), además se encontraron otros reportes que centran su atención en el estudio de las rutas metabólicas de degradación del carbaril por aislamientos bacterianos (Larkin y Day, 1986; Bollag y Liu, 1971; Rajagopal *et al.*, 1984; Ramanand *et al.*, 1988; Sudy *et al.*, 1972), como también la degradación de carbaril descrita por Chapalamadugu y Chaudhry, 1991, por un consorcio microabiano de *Pseudomonas* sp. (Figura 2e), la caracterización de la enzima carbaril hidrolasa (Derbyshire *et al.*, 1987; Hayatsu y Nagata, 1993; Karns y Tomasek, 1991) y análisis moleculares de los genes responsables de la degradación de carbaril (Pohlenz *et al.*, 1992).

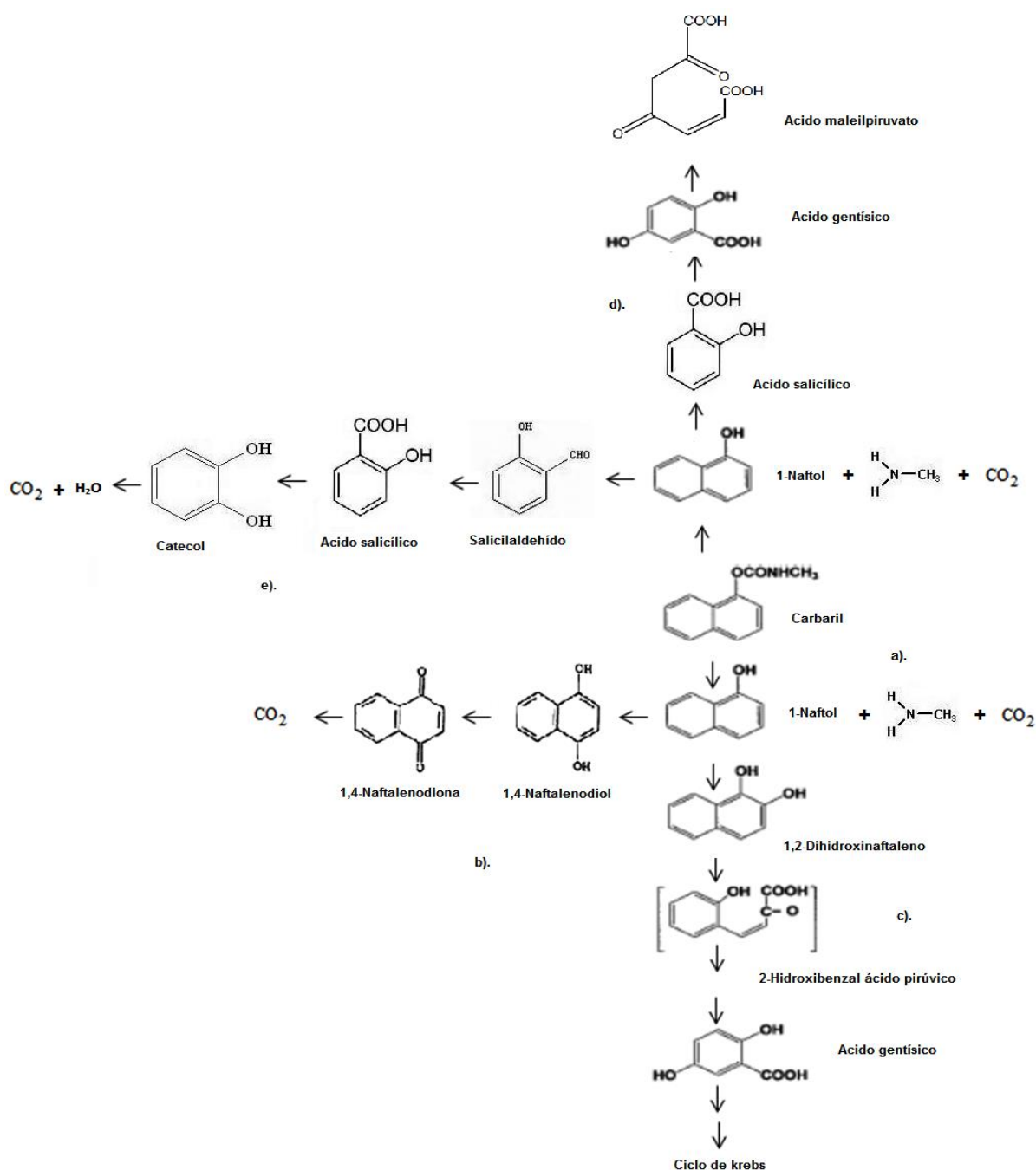


Figura 2. Rutas empleadas por los microorganismos para la degradación de Carbaril. a). Ruta propuesta por Topp *et al.*, 1993; McDonald *et al.*, 2005 para *Aminobacter ciceronei* nov. ER2 b). Ruta propuesta por Sato y Tsukamoto (1999) para *Arthrobacter* spp. c). Ruta propuesta por Swetha y Phale (2007) para *Pseudomonas* sp. C4 d). Ruta propuesta por Doddamani y Ninnekar (2000) para *Micrococcus* sp. e). Ruta propuesta por Chapalamadugu y Chaudhry (1990) para el consorcio microbiano de *Pseudomonas* sp. Fuente: Autores.

Entre los microorganismos aislados y caracterizados, a nivel mundial se encuentra *Sphingomonas* sp., una bacteria que ha sido reportada por su gran capacidad metabólica para degradar compuestos xenobióticos.

Feng *et al.*, (1997), reportó que la *Sphingomonas* sp., CF06, además de degradar carbofuran puede degradar fenol, metilamina, carbaril, gentisato y ácido Procatecoico, así mismo, *Novosphingobium* sp. Cepa FND-3 degradadora de carbofuran, presentó degradación cruzada con isoprocab, metolcarb y metomil (Yan *et al.*, 2007). De otro lado, también se han caracterizado *Sphingomonas* sp., capaces de mineralizar naftaleno, tolueno, p-cresol, benzoato, salicilato, como también bisfenol (Fredrickson *et al.*, 1995). Esto indica el alto potencial que poseen estas bacterias para descontaminar aguas y suelos contaminados.

La versatilidad metabólica de estos organismos sugiere que han desarrollado mecanismos para adaptarse rápidamente y llevar a cabo eficientemente la degradación de nuevos compuestos en el ambiente, con respecto a otros géneros bacterianos (Stolz, 2009). Análisis comparativos por estudios de hibridización de ADN y comparación de secuencias de genes involucrados en vías degradativas, han demostrado que las *Sphingomonas* generalmente usan rutas degradativas similares a otros grupos de microorganismos, pero se desvían de estos por la existencia de múltiples oxigenasas y la conservación de grupos de genes específicos localizados en plásmidos, los cuales experimentan pronunciados arreglos genéticos y únicamente pueden ser diseminados entre *Sphingomonas* sp. (Stolz, 2009; Huong *et al.*, 2007; Jouanneau y Meyer, 2006).

Estudios realizados por Castellanos y colaboradores 2013 aislaron y caracterizaron bacterias *Sphingomonas* sp., degradadoras de carbofuran., vía carbofuran 7-fenol hasta mineralización completa, bajo condiciones *in vitro* en medio mínimo de sales minerales con carbofuran como única fuente de carbono y/o nitrógeno, de suelos cultivados con un historial de aplicación de 8 años.

1. 5. JUSTIFICACIÓN

En Colombia son muy pocos los esfuerzos que se han hecho para estudiar la biorremediación de plaguicidas como el carbaril, siendo este plaguicida muy utilizado en el cultivo de papa, los estudios que se han realizado en este campo son primordialmente de carácter fitosanitario con la finalidad de evaluar el efecto residual de los plaguicidas N-metilcarbamatos y sus metabolitos en cultivos alimenticios como papa y fresa en el altiplano Cundiboyacense (Castro, 2003; Valencia, 2005).

A pesar de los efectos nocivos para el medio ambiente y la salud, la venta y posterior uso de plaguicidas químicos en la agricultura, está en significativo aumento, según cifras establecidas por la Rapal, Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina en 1994 se superaban los 27 mil millones de dólares, entre 1995 y 1996 superaron los 30 mil millones y en 1997 y 1998 pasaron de 31 mil millones de dólares, en 1999 por primera vez en casi 10 años bajaron a 29,6 mil millones, 4,5% menos que en 1998 (Nivia *et al.*, 2000).

En Colombia, según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) existen 1251 productos registrados con actividad plaguicida, siendo los cultivos con mayor demanda de plaguicidas en el país: arroz (21 %), papa (19 %), pastos (14 %), banano (7 %), caña de azúcar (6 %), café (5 %), hortalizas (5 %), algodón (4 %), flores (4 %), maíz (4 %), tomate (3 %) y frutales (3 %), del ámbito departamental no se tiene información sobre volúmenes de plaguicidas utilizados.

El cultivo de papa es la principal actividad agrícola de la zona andina Colombiana, es desarrollada por cerca de 90.000 familias. En la actualidad se cultivan en Colombia alrededor de 156.568 hectáreas, según estadísticas del Fondo para el Financiamiento del sector Agropecuario (FINAGRO, 2009).

En el departamento de Boyacá, el cultivo de papa es considerado como el cultivo con mayor demanda de agroquímicos y el primer cultivo con mayor demanda de uso y aplicación de

plaguicidas entre ellos como ejemplo se tiene al carbaril que es usado en el cultivo de papa para controlar principalmente el Pilme de la papa (*Epicauta pilme*) y el Bicho bolita (*Armadillidium vulgare*). Según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en la mayoría de zonas con cultivos de papa, principalmente en Boyacá, se emplean inadecuadamente los agroquímicos, debido a la alta frecuencia de aplicación, sobredosificación, mezcla de productos y condiciones inadecuadas de manipulación, almacenamiento y disposición final de los mismos (Rodríguez, 1996; Hill *et al.*, 2000). El empleo incontrolado del carbaril puede suponer un grave riesgo y efectos negativos como la presencia de residuos y metabolitos de este compuesto en el medio ambiente y en los alimentos (Cebrián *et al.*, 1988; Ramírez, 2001).

Debido a la utilización inapropiada de los plaguicidas, particularmente su uso en exceso, su aplicación en tiempos no apropiados y en cultivos en los que no han sido registrados, hacen de estas sustancias un riesgo potencial para la salud humana y para el ambiente en general, debido a que se trata de productos tóxicos, que pueden permanecer como residuos en el producto final que va al consumidor, y por tanto, reducen su calidad (Guerrero, 2003). La presencia de estos residuos depende en gran medida del grado de persistencia de los plaguicidas, que es muy diverso; mientras unos se degradan con rapidez, otros son muy persistentes y para su disipación, precisan de amplios periodos de tiempo. En muchos casos, el suelo y las aguas subterráneas se convierten en reservas ambientales de estos residuos, desde los cuales se pueden desplazar, a través de una gran variedad de rutas, a la atmósfera, aguas y organismos vivos, donde sufren diferentes procesos de acumulación, degradación y disipación (Goodman *et al.*, 1982; Mohammad y Landeros, 2007).

Actualmente, en la búsqueda de soluciones para la descontaminación ambiental han surgido metodologías de bajo impacto en el medio ambiente como la biorremediación, donde se aprovechan los procesos naturales mediante los cuales bacterias u otros microorganismos alteran y convierten moléculas orgánicas en otras sustancias, los compuestos orgánicos son inestables y los microorganismos pueden generar la mineralización de un compuesto orgánico, es decir la degradación total del mismo, cuando se generan como productos finales

CO₂ y CH₄ en anaerobiosis y CO₂ en aerobiosis, además de H₂O y NH₃ (Castillo *et al.*, 2005).

La biorremediación presenta ventajas sobre otras técnicas alternativas para eliminar compuestos contaminantes como son los tratamientos físico-químicos, ya que es un proceso natural para destruir contaminantes orgánicos, la relación costo/efectividad es menor comparada con otras tecnologías y puede ser ejecutada *in situ* (Castillo *et al.*, 2005).

Se pueden emplear diversos organismos en los procesos de remediación, sin embargo, los mayormente empleados son las bacterias, gracias a su capacidad de metabolizar un amplio espectro de compuestos. Actualmente se han reportado diferentes estrategias para degradar carbaril y otros *N*-metilcarbamatos, como el uso de métodos químicos, físicos y fotoquímicos; encontrando que a diferencia de estos métodos la biorremediación bacteriana en la mayoría de los casos resulta más efectiva, amigable con el medio ambiente y fácilmente aplicable *in situ* (Atrevi *et al.*, 2002). La biorremediación suele tener menores costos que otros tratamientos, como la incineración, utilizada para remover sustancias tóxicas del suelo, otra ventaja es que la biorremediación tiene como objeto degradar y destoxificar contaminantes peligrosos, mientras que otras tecnologías simplemente transfieren los contaminantes a una localización diferente (Solbio, 2006).

Según estudios realizados a nivel mundial, gran variedad de bacterias cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para transformar compuestos xenobióticos, entre ellos los plaguicidas, lo cual hace que sea una alternativa factible, no costosa y amigable con el medio ambiente (Dua *et al.*, 2002).

A nivel mundial se han aislado y caracterizado bacterias capaces de degradar plaguicidas, entre ellas se encuentran microorganismos con alto potencial de degradación de carbamatos, se ha reportado *Sphingomonas* sp., y géneros relacionados, debido a que se ha determinado que pueden utilizar plaguicidas como única fuente de carbono y/o nitrógeno, degradándolo en metabolitos menos tóxicos hasta su mineralización completa, lo cual podría contribuir a disminuir, mitigar o biorremediar la concentración de plaguicidas en ambientes donde exista

residualidad (Ogram *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1997). Se ha reportado que *Sphingomonas* sp, además de degradar el plaguicida N-metilcarbamato carbofuran, posee también la capacidad para degradar carbaril, propoxur, aldicarb, gentisato y ácido procatecoico (Feng *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006).

Estudios realizados en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, permitieron aislar bacterias de suelos del municipio de Silos Norte de Santander, cultivados con papa, con historia de aplicación de ocho años de plaguicidas, con características fisiológicas similares a *Sphingomonas* sp., capaces de degradar el plaguicida carbofuran como única fuente de carbono y/o nitrógeno respectivamente (Castellanos *et al.*, 2013a). El objetivo de este trabajo es determinar la degradación de carbaril por la cepa *Sphingomonas* sp., S8-M3-13 en condiciones *in vitro*.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la biodegradación del plaguicida N-metilcarbamato carbaril, por la bacteria *Sphingobium* sp. S8-M3-13 en condiciones *in vitro*.

1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el crecimiento del aislamiento bacteriano S8-M3-13, en medio mínimo de sales con carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno (MMSM-carbaril).
- Identificar el aislamiento bacteriano S8-M3-13 mediante análisis y amplificación de la secuencia del ADNr 16S.
- Estandarizar las técnicas analíticas para la biodegradación de carbaril por el aislamiento bacteriano S8-M3-13 en medio mínimo de sales minerales.

- Realizar la cinética de biodegradación de carbaril por *Sphingobium* sp., S8-M3-13 en condiciones *in vitro*.

CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Carbaril (pureza, 98%) se adquirió de Aldrich (Milwaukee, WI). Los disolventes utilizados en este estudio fueron grado HPLC y se adquirieron de Scharlau (Barcelona, España). Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico y disponible comercialmente.

2.1. CULTIVO DE LA BACTERIA

Se utilizó la cepa bacteriana S8-M3-13, la cual fue aislada de suelos cultivados con papa con historia de aplicación de plaguicidas de 8 años (Castellanos *et al.*, 2013a). La cepa bacteriana criopreservada en medio Gherna y mantenida a -20°C, fue recuperada realizando siembras por aislamiento en placas con agar medio mínimo de sales minerales con carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno (agar MMS-carbaril) después de que fueran incubadas a 25°C durante 72 h.

Las placas de agar MMS-carbaril, fueron preparadas según Kim y colaboradores en el 2004, cuya composición es la siguiente (g/L): K₂HPO₄, 7.5; KH₂PO₄, 2.0; NaCl, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.2; CaCl₂·2H₂O, 0.02; 10 mL de la solución de elementos trazas que contiene 20 mg de Na₂MoO₄·2H₂O, 50 mg de H₂BO₃, 30 mg de ZnCl₂, 10 mg de CuCl₂, y 20 mg de FeCl₃ por litro. Posteriormente se ajustó el pH a 7,2, se agregó 15 g/L de agar-agar y se autoclavó a 121°C, a 15 libras de presión por 15 minutos. Se dejó enfriar a 55°C y se agregó 100 mg/L de carbaril disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO, 1 mL por litro) homogenizando el medio de cultivo. Por último se sirvió el medio en cajas de petri estériles.

Para comprobar el crecimiento de la bacteria a partir del metabolito intermediario 1-naftol, se sembró la bacteria por aislamiento en agar MMS-1-naftol, el cual se preparó con las sales minerales anteriormente mencionadas, adicionando 1 g/L de sulfato de amonio como única

fuentes de nitrógeno y 100 mg/L de 1-naftol como única fuente de carbono. Las placas de Petri sembradas con la bacteria, se incubaron a 25°C durante 15 días.

Como control del crecimiento microbiano a partir de carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno y de 1-naftol como única fuente de carbono, se cultivó la bacteria en agar medio mínimo de sales minerales con DMSO como única fuente de carbono y en medio mínimo de sales minerales sin carbaril y sin 1-naftol, respectivamente.

2.2. IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA

La identificación bacteriana se llevó a cabo mediante amplificación y análisis de la secuencia del ADNr 16S. Para el análisis de la secuencia, las células fueron cultivadas en agar nutritivo a 25°C durante 24 h. Se recuperó la biomasa bacteriana y se realizó la extracción de ADN total, utilizando el kit de extracción Wizard® Genomic DNA purification Kit de Promega EE.UU, catálogo No. A1125, siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las extracciones se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio, empleando un transiluminador de luz ultravioleta y electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0%. Se comprobó la pureza del ADN mediante la relación de absorbancia de 260/280 nm, utilizando un espectrofotómetro UV visible marca Genesys. Posteriormente, un fragmento de 1465 pb del gen ribosomal 16S, se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT).

Luego se realizó limpieza manual de cada una de las secuencias de los fragmentos obtenidos, la secuenciación se llevó a cabo por un secuenciador automatizado modelo ABI3700 y se realizó con los paquetes de software DDBJ. El análisis taxonómico de la secuencia del ADNr 16S se realizó mediante la comparación con otras secuencias ADNr 16S disponibles en las bases de datos del GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project) utilizando el programa CLUSTALX 1.8.3. El análisis filogenético fue realizado mediante el software MEGA versión 3.0, calculando las distancias

mediante el modelo de dos parámetros de Kimura y construyendo el árbol de distancias por el método de Neighbor-Joining con un bootstrap de 10.000 iteraciones.

2.3. METODO ESPECTOFOTOMÉTRICO

La concentración de carbaril fue determinada por el método espectrofotométrico descrito por Rangaswamy *et al.*, 1976 y Zhelev *et al.*, 2004 para carbofuran, pero modificado para carbaril. El método se fundamenta en la interacción del metabolito 1-naftol producido por la hidrólisis alcalina de carbaril con anilina diazotizada produciendo un colorante azoico o azocompuesto (Figura 3).

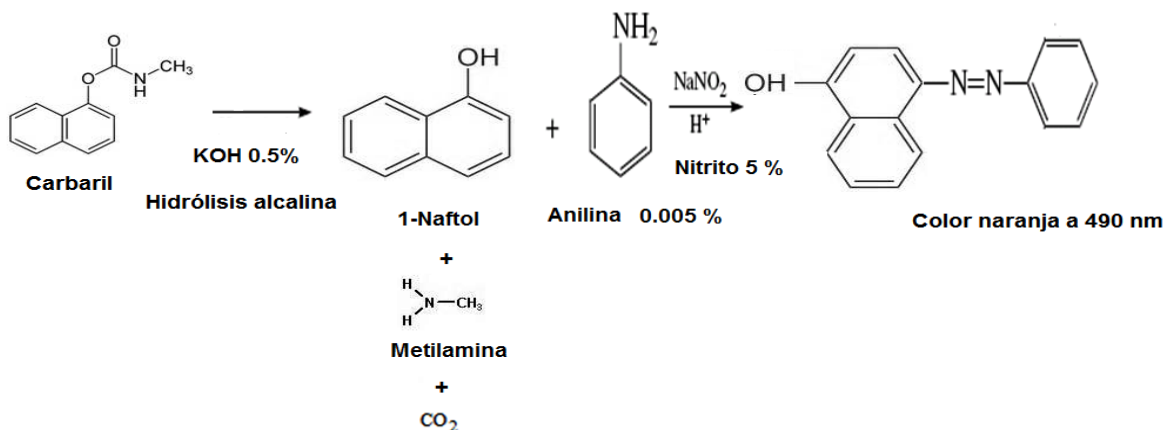


Figura 3. Reacción de diazotización para carbaril. Fuente: autores

En primera instancia se preparó una solución stock de 250 mg/L del plaguicida en metanol, como también soluciones de anilina al 0.005 % en HCl 0.1 N, NaNO_2 al 5% y de KOH al 0.5 N en agua destilada. Luego en frascos ambar de aproximadamente 10 mL se realizó la reacción de diazotización mezclando 1 mL de anilina, 0.5 mL de NaNO_2 , 1 mL de solución stock de carbaril, se agitó vigorosamente y se agregó 1 mL de KOH a cada frasco, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo, se aforó a 5 mL con metanol y posteriormente se realizó un barrido en el espectrofotómetro HACH DR 4000 con el fin de determinar la longitud de onda a la cual tiene mayor valor de absorbancia.

Luego de determinar la longitud de onda a la cual más absorbe, se evaluaron algunos de los parámetros básicos de una validación como linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y rango.

La linealidad fue establecida realizando una curva de calibración a partir de disoluciones acuosas del stock de 250 mg/L del plaguicida en metanol, a los niveles de concentración de 0.5, 1.0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 mg/L de carbaril, por triplicado. Posteriormente en frascos ambar de aproximadamente 10 mL de capacidad, se realizaron las reacciones de diazotización como se describió anteriormente (1 mL de anilina, 0.5 mL de NaNO_2 , 1 mL de cada solución estándar de carbaril), se agitó vigorosamente y se agregó 1 mL de KOH a cada frasco, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, se aforó a 5 mL con metanol y posteriormente se midió la absorbancia a la longitud de onda determinada (490 nm), contra un blanco que consistió en la mezcla de los anteriores reactivos, pero reemplazando solución estándar de carbaril por 1 mL de metanol grado analítico, según especificación de la técnica.

La linealidad fue determinada mediante análisis de regresión simple con un nivel de confianza del 95% graficando las concentraciones de carbaril vs las absorbancias obtenidas utilizando el programa Microsoft Excel 2010. También se realizó un ANOVA a una vía utilizando el programa SPSS v 1.8, con el objetivo de encontrar relación de dependencia entre variables.

Para la precisión del método, se evaluó por la repetitividad y la precisión intermedia, en el caso de repetitividad, el estudio se realizó por quintuplicado para cada muestra a una concentración de 1, 5, 30 y 60 mg/L de carbaril, esta valoración al igual que las diluciones se prepararon y analizaron por un mismo analista, el mismo día, en el caso de la precisión intermedia, el estudio se realizó por quintuplicado para cada muestra a una concentración de 1, 5, 30 y 60 mg/L de carbaril, la valoración y las diluciones, se prepararon por 3 analistas, en 3 días diferentes.

La exactitud del método se determinó mediante el porcentaje de recuperación de carbaril. Para ello se prepararon tubos con medio de cultivo mínimo de sales minerales (MMS), con y sin bacteria y se fortificó con carbaril a un nivel de concentración (10, 50 y 100 mg/L) por triplicado. Se realizaron extracciones líquido-líquido de cada muestra con cloroformo seis veces. El cloroformo fue evaporado a temperatura ambiente y el exceso de agua fue eliminado y secado en un desecador que contiene sílica gel, los residuos posteriormente fueron disueltos en metanol. El porcentaje de recuperación de carbaril del medio de cultivo fue determinado dentro de la curva de calibración.

Se determinó el límite de detección (LDD) mediante la comparación de diez mediciones de muestras con niveles de baja concentración del analito (0.5, 1, 5.0 mg/L) y tomando como referente un blanco. De igual manera se determinó el límite de cuantificación (LDC) mediante la comparación de tres mediciones de muestras con niveles de baja concentración del analito (0.5, 1, 5.0 mg/L) y tomando como referente un blanco. Tanto para el límite LDD como el LDC se determinó la concentración promedio para cada una de las concentraciones y el coeficiente de variación.

2.3.1 BIODEGRADACIÓN DE CARBARIL POR EL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

La biodegradación de carbaril y el crecimiento celular bacteriano, fueron examinados simultáneamente en los mismos frascos de cultivo, para la biodegradación de carbaril, una colonia de la bacteria crecida en MMS-carbaril fue sembrada de forma masiva sobre placas de Petri con agar nutritivo, las cuales fueron incubadas a 25°C durante 24 h. La biomasa bacteriana fue recuperada en tubos ependorff, centrifugada a 5000 r.p.m durante 2 minutos a temperatura ambiente y lavada dos veces con MMS-carbaril, se ajustó la biomasa a una densidad óptica (OD) de 1.2 a 600 nm (A600) y posteriormente se inoculó 1 mL en matraces que contienen 100 mL de MMS-carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno (Kim *et al.*, 2004). Luego los cultivos se incubaron en un agitador rotatorio a 25°C y 150 rpm en oscuridad, el procedimiento se realizó por triplicado y el control consistió en MMS-carbaril,

sin inóculo bacteriano. Para determinar la degradación de carbaril, se tomaron alícuotas de 1 mL periódicamente de los matraces de cultivo que contienen células y MMS-carbaril, a las cuales se les realizó la extracción del plaguicida utilizando cloroformo volumen-volumen seis veces, los extractos orgánicos obtenidos anteriormente se recolectaron y evaporaron utilizando un shaker temperado a 25°C y 150 rpm en oscuridad, posteriormente se realizó la reacción de diazotización descrita anteriormente en el método espectrofotométrico.

2.4. METODO CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC-UV)

El análisis de carbaril y del principal metabolito de su degradación se realizó mediante la técnica HPLC-UV, se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer, instrumento equipado con una interface (Perkin Elmer, Serie 600, Serial Núm. 600 M00091359) una bomba binaria (Perkin Elmer, Serie 200, Serial Núm. 291N1042102, Part Núm. N2910101) un automuestreador para 100 viales con control de temperatura (Perkin Elmer, Serie 200, Serial Núm. 293N1022005) un desgasificador (Perkin Elmer, Serie 200) un detector UV/VIS (Perkin Elmer, Serie 200, Serial Núm. 292N1042003, Part Núm. N2920010) también se utilizó una columna C18: 25 cm x 4.6 mm d.i 5 µm.

Se establecieron las condiciones óptimas para la separación y determinación de carbaril y 1-naftol simultáneamente de acuerdo a las condiciones descritas en la literatura (Kim *et al.*, 2004). En primera instancia, se preparó una solución estándar de carbaril y de 1-naftol a 250 mg/L, posteriormente se realizó un barrido para determinar la longitud de onda de máxima absorción para carbaril y 1-naftol respectivamente en un espectrofotómetro HACH DR 5000. Luego, se evaluó la fase móvil con diferentes eluciones isocráticas donde se realizaron ensayos de diferentes proporciones utilizando los solventes metanol, agua y acetonitrilo 50:50, 70:30, 60:40 y 55:45 respectivamente y a la vez con diferentes flujos 0.5, 1.0, 1.2, 1.5 mL/minuto, se inyectaron 10 µL de muestra, con detección UV a la longitud de onda determinada anteriormente. Posteriormente, se observó la separación de las señales, el área, la forma y los tiempos de retención en la corrida cromatográfica, que se realizó por un tiempo

de 30 minutos, logrando comprobar los tiempos de retención tanto para carbaril como para 1-naftol.

Posteriormente se realizaron las curvas de calibración para determinar simultáneamente carbaril y 1-naftol. Para ello se prepararon concentraciones estándar de carbaril y 1-naftol a partir de soluciones estándar de 250 mg/L en metanol en diferentes proporciones como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Combinaciones de concentraciones de carbaril y 1-naftol utilizadas para la realización de la curva de calibración

SOLUCIONES ESTÁNDAR	CARBARIL (mg/L)	1-NAFTOL (mg/L)
1	99	1
2	95	5
3	90	10
4	80	20
5	50	50
6	20	80
7	10	90
8	5	95
9	1	99

Fuente: Autores

Luego de realizar las curvas de calibración, se determinó el porcentaje de recuperación de carbaril y de 1-naftol. Para ello se prepararon tubos con medio de cultivo mínimo de sales minerales (MMS), con y sin bacteria y se fortificó con carbaril a un nivel de concentración (10, 50 y 100 mg/L) por triplicado. El carbaril fue extraído de cada muestra con cloroformo volumen: volumen V/V, 6 veces. El cloroformo fue evaporado a temperatura ambiente y las muestras fueron secadas en un desecador que contiene silica gel, los residuos posteriormente fueron disueltos en metanol, el porcentaje de recuperación de carbaril del medio de cultivo fue determinado dentro de la curva de calibración.

2.4.1 BIODEGRADACIÓN DE CARBARIL POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC-UV)

La biodegradación de carbaril y el crecimiento celular bacteriano fueron examinados simultáneamente. Para determinar la biodegradación de carbaril, una colonia de la bacteria crecida en MMS-carbaril fue sembrada de forma masiva sobre placas de Petri con agar nutritivo, las cuales fueron incubadas a 25°C durante 24 h. La biomasa bacteriana fue recuperada en tubos falcon, centrifugada a 5000 r.p.m durante 5 minutos a temperatura ambiente y lavada dos veces con MMS-carbaril, se ajustó la biomasa a una densidad óptica (OD) de 1.2 a 600 nm (A600) y posteriormente se inocularon 100 µL en tubos Falcon con 10 mL de MMS-carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno. También se prepararon controles, los cuales consistieron en MMS-carbaril, sin inóculo bacteriano. Los tubos se incubaron en un Shaker temperado a 25°C y 200 rpm en oscuridad.

Para determinar el crecimiento celular a partir de carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno, se tomaron alícuotas periódicamente de 100 µL de tubos con MMS-carbaril inoculados con y sin bacteria (control). A cada alícuota se les realizaron diluciones seriadas en base 10. De cada dilución se extendieron 100 µL sobre placas de Petri con agar MMS-carbaril, las cuales fueron posteriormente incubadas a 25°C durante 15 días. Pasado el tiempo de incubación, se realizó el recuento de células viables UFC/mL de acuerdo con Madigan y colaboradores, 2002.

Para determinar la degradación de carbaril, se tomaron periódicamente tres tubos con MMS-carbaril inoculados con bacteria y tres tubos control (MMS-carbaril sin bacteria). A estos tubos se les realizó la extracción del plaguicida utilizando cloroformo volumen-volumen (V/V) seis veces. Los extractos orgánicos obtenidos anteriormente, se recolectaron y se

evaporaron a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en metanol, y una alícuota del residuo, con un tamaño de muestra de 10 μL se inyectó en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC). La concentración de carbaril y de 1-naftol fue determinada dentro de la curva de calibración.

2.4.2 BIODEGRADACIÓN DE 1-NAFTOL POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC-UV)

La biodegradación y el crecimiento celular bacteriano a partir de 1-naftol como única fuente de carbono, fueron examinados simultáneamente. Para determinar la biodegradación de 1-naftol, una colonia de la bacteria en agar nutritivo, fue sembrada en tubos Falcon con caldo BHI (caldo infusión cerebro-corazón). Los tubos fueron incubados a 25°C durante 24 h (cultivo *overnight*). La biomasa bacteriana fue recuperada por centrifugación a 5000 r.p.m durante 5 minutos a temperatura ambiente y lavada dos veces con MMS-1-naftol, se ajustó la biomasa a una densidad óptica (OD) de 1.2 a 600 nm (A_{600}) y posteriormente se inocularon 100 μL en tubos Falcon con 10 mL de MMS-1-naftol. También se prepararon controles, los cuales consistieron en MMS-1-naftol sin inóculo bacteriano. Los tubos se incubaron en un Shaker temperado a 25°C y 200 rpm en oscuridad.

Para determinar el crecimiento celular a partir de 1-naftol como única fuente de carbono, se tomaron alícuotas periódicamente de 100 μL de los tubos con MMS-1-naftol inoculados con y sin bacteria. A cada alícuota se les realizaron diluciones seriadas en base 10. De cada dilución se extendieron 100 μL sobre placas de Petri con agar MMS-1-naftol, las cuales fueron posteriormente incubadas a 25°C durante 8 días. Pasado el tiempo de incubación, se contaron las colonias que aparecieron sobre las placas de Petri y se realizó el recuento de células viables UFC/mL de acuerdo con Madigan y colaboradores 2002.

Para determinar la degradación de 1-naftol, se tomaron periódicamente tres tubos con MMS-1-naftol inoculados con bacteria y tres tubos control (MMS-1-naftol sin bacteria) a los cuales se les realizó la extracción del plaguicida utilizando cloroformo volumen-volumen seis veces.

Los extractos orgánicos obtenidos anteriormente, se recolectaron y evaporaron utilizando un shaker temperado a 25°C y 150 rpm en oscuridad. El residuo se disolvió en metanol y una alícuota del residuo, con un tamaño de muestra de 10 µL se inyectó en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), las concentraciones de 1-naftol fueron determinadas mediante la curva de calibración.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CULTIVO DE LA BACTERIA

El crecimiento del aislamiento S8-M3-13 en las placas de Petri con agar MMS-carbaril, fue evidenciado sobre agar MMS-carbaril, por la aparición de colonias color amarillo, pequeñas, redondas, definidas, las cuales aparecieron después del proceso de incubación de las cajas de Petri a 25°C durante 8 días, no se presentaron pigmentos, por otro lado, no se presentó crecimiento en las cajas con agar medio mínimo de sales minerales con DMSO (dimetilsulfoxido), lo cual indica la incapacidad de la bacteria para utilizar el DMSO como fuente de carbono, en medio mínimo de sales sin carbaril la bacteria tampoco creció indicando que el crecimiento bacteriano se presenta por la utilización de carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno, al observar las células al microscopio se identifican bacilos cortos irregulares Gram negativos los cuáles forman rosetas en medios complejos, en medio selectivo, forman agregados similares a hifas, oxidasa β-D- galactosidasa negativa y catalasa positiva.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA

El análisis taxonómico de la cepa S8-M3-13, indica que la secuencia problema ensamblada de 1422 pb, tiene un 99% de identidad en el 100% de su longitud, con una secuencia perteneciente a la especie *Sphingobium aromaticiconvertens* (AM181012), la cual se caracteriza por degradar 3-chlorodibenzofuran como única fuente de carbono y energía, también existe similitud con otras secuencias del género *Sphingomonas* degradadoras de carbofuran con puntajes también muy altos, se presentó 92% de similaridad con

Sphingomonas sp., SB5, 93% de similaridad a *Novosphingobium* sp., y 94% de identidad a *Sphingomonas* sp., CF06, por su parte, el clasificador del Proyecto de Base de Datos del Ribosoma (RDP), pudo determinar que se trata de una secuencia del género *Sphingobium* con un 100% de confiabilidad. El árbol de distancias construido por el método de Neighbor-Joining con un bootstrap de 10.000 iteraciones, agrupó a la secuencia problema en el clado más interno con una secuencia perteneciente a *Sphingomonas* sp., con un soporte de ramas del 69%. La secuencia problema pertenece a su vez a un clado más grande en donde se encuentran secuencias pertenecientes a los géneros *Sphingomonas*, *Sphingobium* y otras secuencias a las cuales no se les ha determinado clasificación taxonómica en bases de datos. Este clado tiene un soporte de ramas del 100% (Figura 4).

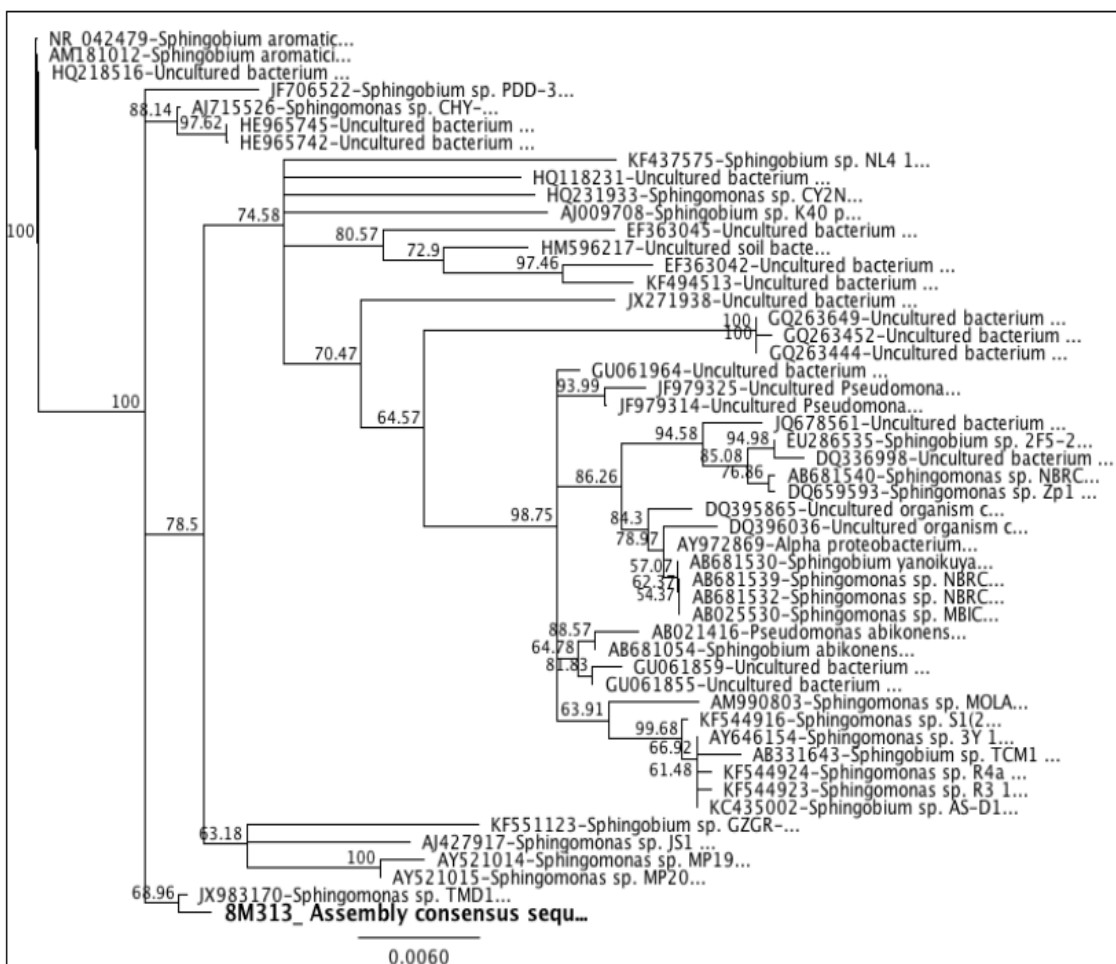


Figura 4. Análisis filogenético del aislamiento S8-M3-13 y de especies relacionadas construido a partir de los 50 mejores “hits” con respecto a la base de datos de NCBI por el método de neighbor joining. Los valores Bootstrap

(%) se indican en los nodos, las barras de escala representan los valores de sustitución/sitio de 0.0060. En negrita, el nodo correspondiente a la secuencia problema. Fuente: Autores

De acuerdo a la base de datos, bacterio.net (www.bacterio.net/s/sphingomonas.html) el género *Sphingobium* junto con los géneros *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* y la especie *Blastomonas ursicola* deben ser tratados como especie del género *Sphingomonas*. De acuerdo a todo lo anterior, la secuencia problema pertenece a una especie del género *Sphingomonas*. Lo cual coincide con los resultados de la caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica realizada por Castellanos *et al.*, 2013a, en donde las cepas aisladas del suelo con ocho años de aplicación de plaguicida (Carbofuran) fueron caracterizadas como *Sphingomonas* sp. Con respecto a la identificación de la especie estudios realizados por Sato *et al.*, (1999), quien reportó dos nuevas cepas bacterianas que degradan rápidamente carbaril, fueron caracterizadas por su contenido de guaninas y citosinas (G+C), la composición de ácidos grasos, la presencia de menaquinona isopregnenolona y el análisis del gen 16S rRNA, Por lo tanto se considera importante realizar los anteriores análisis para confirmar que se trata de una nueva especie que conllevaría al estudio y caracterización de la nueva especie, para poder utilizarla en diversidad de procesos investigativos.

3.3. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Al realizar reacción de diazotización con la solución stock de carbaril cuya concentración es de 250 mg/L se produjo un color anaranjado. Al realizar el barrido de la longitud en el espectrofotometro, se determinó que la mayor absorbancia del compuesto anaranjado es de 490 nm.

Con respecto a la linealidad, los coeficientes de correlación obtenidos fueron muy cercanos a la unidad prevaleciendo una correlación positiva, indicando una relación directa de dependencia entre las 2 variables, a medida que aumenta la concentración, aumenta la absorbancia. El criterio de aceptación para este método analítico es un coeficiente de correlación de 0.95 y por los datos obtenidos las linealidades se consideran válidas. Se

presentó linealidad entre las concentraciones de 5 a 100 mg/L con un R^2 de 0.983, como lo demuestra figura 5.

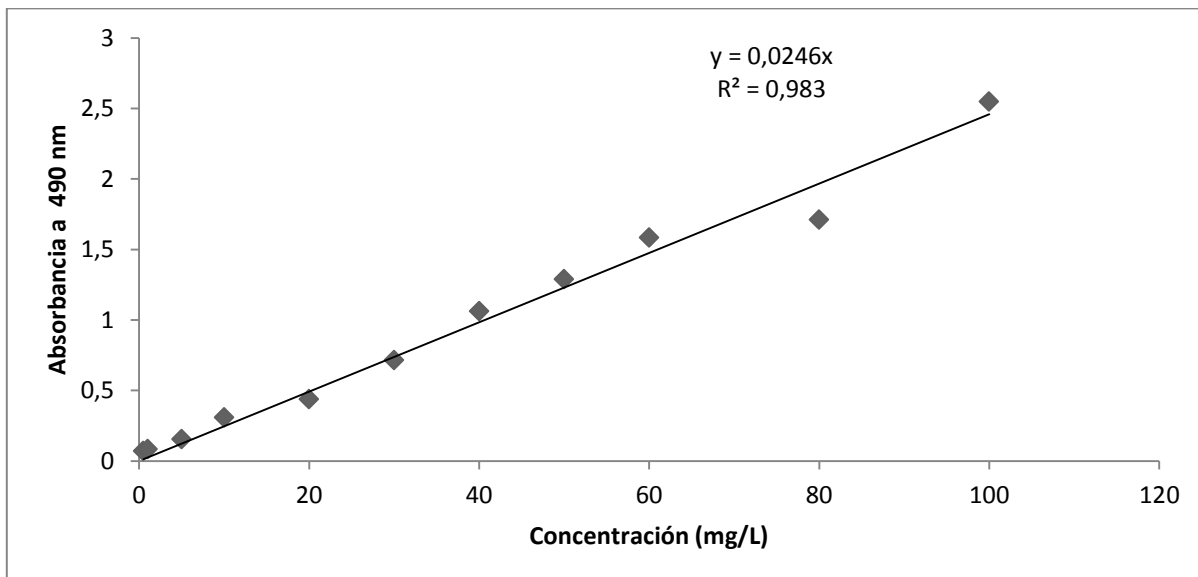


Figura 5. Curva de calibración obtenida para la determinación de carbaril mediante la técnica espectrofotométrica. Fuente: Autores

Para la precisión del método, se evaluó por medio de la repetitividad y precisión intermedia. En el caso de repetitividad, el estudio se realizó por quintuplicado para cada muestra a una concentración de 1, 5, 30 y 60 mg/L de carbaril. Esta valoración al igual que las diluciones se preparó y analizó por un mismo analista, el mismo día. Los ensayos realizados nos permitieron obtener coeficientes de variación (CV) para las concentraciones 5, 30, y 60 mg/L de carbaril menores al 5%, por lo tanto son aceptables para este tipo de método, no obstante para las concentraciones de 1 mg/L se obtuvo un CV de 37.09, lo cual indica que para esta concentración no hay repetibilidad (tabla 3).

Tabla 3. Ensayo intradía para las concentraciones de Carbaril

CONCENTRACIÓN (mg/L)	PROMEDIO ABSORBANCIA (490 nm)	PROMEDIO CONCENTRACIÓN	DS CONCENTRACIÓN (mg/L)	% CV CONCENTRACIÓN (mg/L)
1	0.11	4.08	1.51	37.09

5	0.11	5	0.04	3.46
30	0.67	27.0	0.66	2.48
60	1.45	58.9	2.30	3.92

DS= Desviación Estandar, CV= coeficiente de Variación. Fuente: Autores.

En el caso de la precisión interdia, el estudio se realizó por triplicado para cada muestra a una concentración de 1, 5, 30 y 60 mg/L. La valoración y las diluciones, se prepararon por tres analistas, en tres días diferentes. Con respecto a la precisión se obtuvo una variabilidad entre analistas por debajo del 5 % del total para las concentraciones de 5, 30 y 60 mg/L, lo cual es aceptable para este tipo de método (tabla 4).

Tabla 4. Ensayo interdia para las concentraciones de carbaril

CONCENTRACIÓN (mg/L)	PROMEDIO ABSORBANCIA (490 nm)	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/L)	DS CONCENTRACIÓN (mg/L)	%CV CONCENTRACIÓN (mg/L)
1	0.10	4.42	0.54	12.26
5	0.12	5.15	0.17	3.46
30	0.65	26.64	0.60	2.26
60	1.32	53.78	2.8	5.0

DS= Desviación Estandar, CV= coeficiente de Variación. Fuente: Autores

Para la exactitud se obtuvo un porcentaje de recuperación con valores entre 100.9% y 88.61% con una variabilidad entre 0.06 y 2.75 como lo describe la tabla 5.

Tabla 5. Ensayo de recuperación de carbaril con Cloroformo

Cantidad de carbaril agregado (mg/L)	Promedio de carbaril recuperado (mg/L)	% de Recuperación
10	10.09 ±0.065	100.9
50	47.49 ±1.52	94.98
100	88.61±2.75	88.61

Fuente: Autores

Con respecto al límite de detección y cuantificación se determinó que se puede cuantificar con precisión y exactitud 5 mg/L, la mínima cantidad del analito que se puede detectar es de 0.5 mg/L. Se puede concluir que la técnica puede ser utilizada para cuantificar con precisión y exactitud carbaril en un rango de concentración entre 5 y 60 mg/L.

3.3.1. BIODEGRADACIÓN DE CARBARIL POR EL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

La biodegradación del plaguicida fue evaluada con base al recuento en placa de células viables (logaritmo UFC/mL) y su concentración (mg/L) en un medio mínimo líquido de sales minerales con carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno (MMS-carbaril). La concentración de carbaril fue medida mediante espectrofotometría, utilizando la curva de calibración por interpolación de los valores de concentración del analito obtenidas en cada una de las muestras. En la figura 6 se aprecia que la concentración de carbaril permanece constante, es decir, que no hay degradación de carbaril en un tiempo de incubación de 96 h. No obstante, se observa crecimiento bacteriano a partir de carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno, aunque su crecimiento no es significativo en el tiempo. De acuerdo a lo obtenido en este ensayo, podríamos decir que la biodegradación de carbaril es muy lenta, por lo cual se requiere mayor tiempo para que evidencie significativamente tal biodegradación.

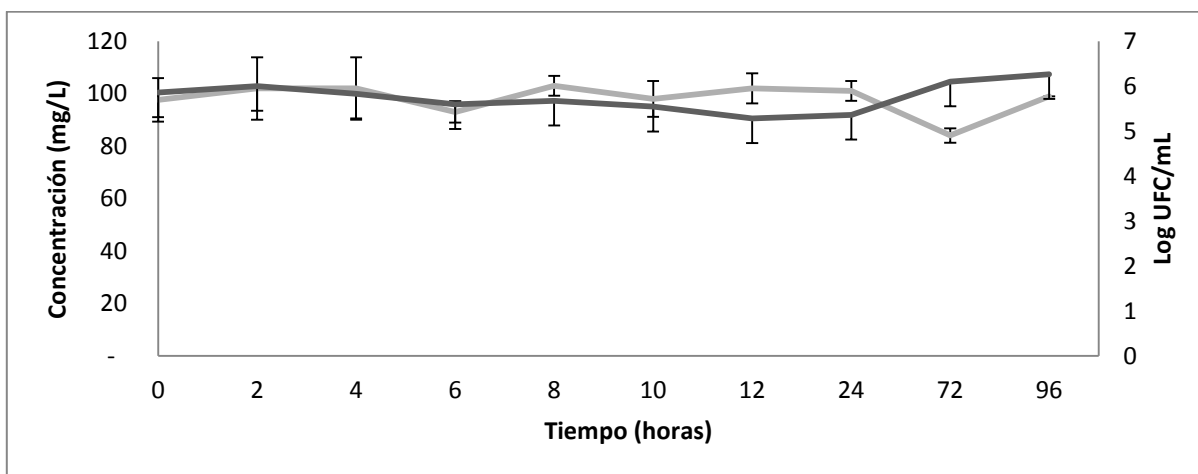


Figura 6. Biodegradación de carbaril utilizando el método espectrofotométrico (—) y crecimiento microbiano de *Sphingobium* sp. S8-M3-13 basado en logaritmo de UFC/mL (—). Los datos son el resultado del promedio de tres mediciones. Las barras verticales indican la \pm DS de tres réplicas. Fuente: Autores

El experimento se repitió 3 veces prolongando los tiempos de incubación hasta 8 días obteniendo los mismos resultados, dentro de la realización del procedimiento, observamos que antes de agregar KOH al 0.5 N, para llevar a cabo la reacción de diazotización, se identificó coloración en la reacción, lo que indicó que el carbaril se hidrolizó hasta 1-naftol, no por el KOH agregado a la reacción, sino por la hidrólisis espontánea en el medio mínimo líquido de sales minerales. Esta reacción fue ligeramente mayor en tubos Falcon con bacteria que con respecto al control (sin bacteria), el carbaril se degrada fácilmente claro ejemplo y según la literatura se reporta que en aguas con un pH alcalino y a temperaturas de 20°C, el carbaril se hidroliza rápidamente a 1-naftol, metilamina y dióxido de carbono, alcanzando una tasa de descomposición del orden del 20% por día (Stewart *et al.*, 1967). En un cuerpo de agua cuyo pH fluctúa entre 7.0 y 7.4, la vida media de este plaguicida es de 10.5 días; sin embargo, a pH 8.0 su degradación es de 1.8 días (Aly y El-Dib; 1971). Por lo tanto es recomendable ampliar los tiempos de degradación, realizar el experimento en condiciones de oscuridad para evitar fotólisis, comprobar el pH del medio del cultivo durante el experimento para evitar hidrólisis alcalina y procesar las muestras lo más rápido posible.

El experimento también nos permitió concluir que es necesario comprobar la degradación de 1-naftol por parte de la bacteria, porque hay varios estudios que reportan bacterias que hidrolizan carbaril a 1-naftol, acumulando este metabolito y creciendo a partir de metilamina como única fuente de carbono y nitrógeno (Chauldry *et al.*, 2004; Topp *et al.*, 1993). Es posible que la bacteria *Sphigobium* sp., S8-M3-13, presente ese tipo de comportamiento, hidrolice el carbaril a 1-naftol y utilice la metilamina como única fuente de carbono y nitrógeno, sin degradar el 1-naftol, lo que podría explicar el crecimiento microbiano en el medio de cultivo, sin evidenciar degradación de plaguicida.

3.4. METODO CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC-UV)

Dado que el método Espectrofotométrico no nos permitió determinar la biodegradación de carbaril, se decidió estandarizar un método cromatográfico que nos permitiera determinar la biodegradación de carbaril y de 1-naftol.

Se determinó que la longitud de onda para carbaril y 1-naftol es de 227 nm. La fase móvil consistió en metanol (solvente A) y agua grado HPLC (solvente B), en relación 55:45 respectivamente, temperatura ambiente, un flujo de 1.2 mL/minuto y un tiempo de corrida de 7 minutos. Bajo estas condiciones, carbaril registró un tiempo de retención de 2.47 mientras que 1-naftol registró un tiempo de retención de 3.49 como lo demuestra la figura 7, en la cual se evidencia la separación de las señales y una buena resolución.

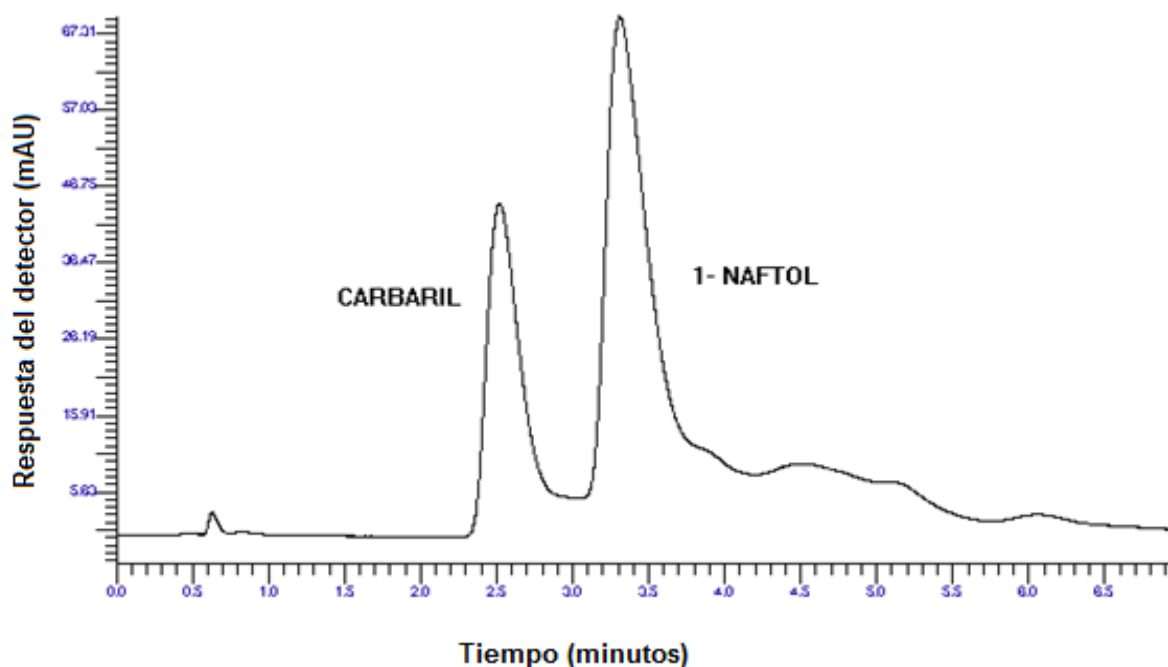


Figura 7. Cromatograma típico de los extractos de cultivo obtenidos de *Sphingobium* sp., S8-M3-13. Los frascos

de cultivo fueron extraídos con cloroformo como se describe en la sección de materiales y métodos. Los extractos resultantes fueron disueltos en metanol. Fuente: Autores

Con respecto a la linealidad, los coeficientes de correlación obtenidos fueron muy cercanos a la unidad prevaleciendo una correlación positiva, indicando una relación directa de dependencia entre las dos variables, a medida que aumenta la concentración, aumenta la absorbancia. El criterio de aceptación para este método analítico es un coeficiente de correlación de 0.95, por tanto los datos se consideran aceptables. Se presentó linealidad entre las concentraciones de 0.5 a 100 mg/L con un R^2 de 0.983 para carbaril y para 1-naftol respectivamente, indicando que el método puede ser utilizado para detectar carbaril entre este rango de concentraciones como lo demuestra figura 8.

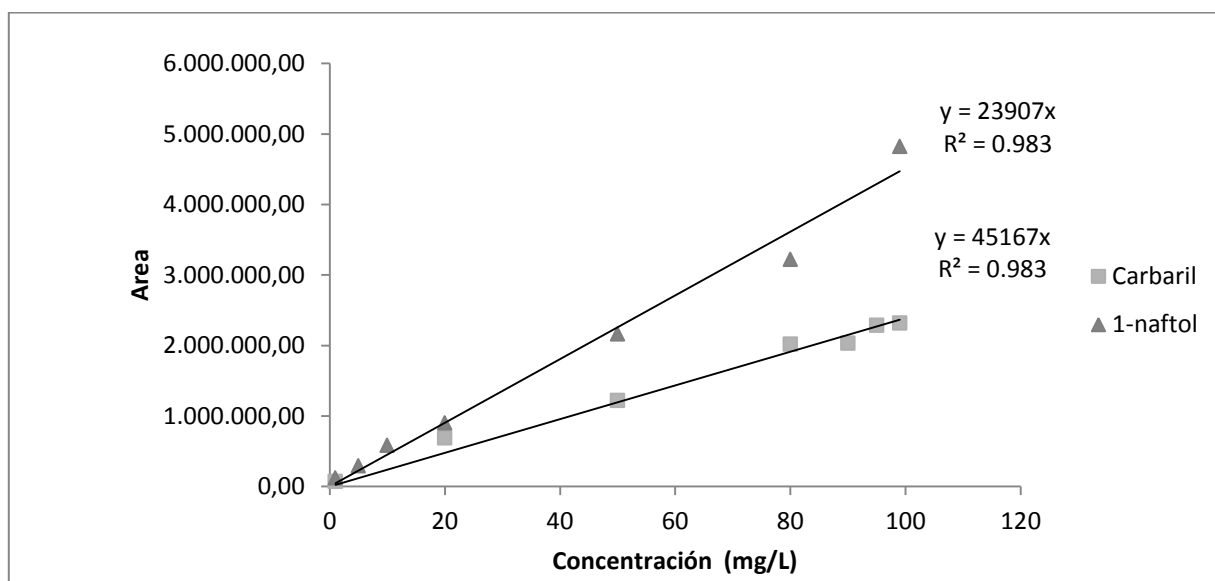


Figura 8. Curva de calibración obtenida para la determinación simultánea de carbaril y 1-naftol mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV). Fuente: Autores

Para la exactitud se obtuvo un porcentaje de recuperación que osciló entre el 85.5% y 98.48%. Se considera que el porcentaje de recuperación es bueno utilizando este método de cuantificación (Tabla 6).

Tabla 6. Ensayo de recuperación de 1-naftol con cloroformo

Cantidad de carbaril agregado (mg/L)	Promedio de carbaril recuperado (mg/L)	% de Recuperación
200	165.085±1	85.50
100	98.02±1.48	98.02
50	49.24±0.77	98.48

Fuente: Autores

Con base a la experiencia obtenida en los experimentos anteriores, se optimizaron las condiciones. Se ampliaron los tiempos de incubación, se verificó el pH en el medio de cultivo, se controló la incidencia de luz y la temperatura y se procesaron las muestras en el menor tiempo posible.

3.4.1. BIODEGRADACIÓN DE CARBARIL POR EL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC-UV)

La utilización de carbaril fue examinada en base al crecimiento bacteriano (Logaritmo UFC/mL) y concentración de carbaril (mg/L) en medio mínimo de sales minerales que contiene carbaril como única fuente de carbono y nitrógeno (MMS-carbaril). La concentración de plaguicia fue medida mediante HPLC-UV, utilizando la curva de calibración (figura 6), por interpolación de los valores de concentración del analito en cada una de las muestras, realizándolo por triplicado, a partir de las áreas reportadas por el equipo.

El crecimiento de *Sphingobium* sp., S8-M3-13 fue lento, la bacteria alcanzó su máximo crecimiento a los cinco días de incubación, posteriormente se mantuvo y disminuyó lentamente, similar a lo observado en el experimento anterior, donde se utilizó el método espectrofotométrico. No obstante, el crecimiento fue significativo durante el tiempo, con

respecto al experimento anterior. Este crecimiento bacteriano fue acompañado con la desaparición de carbaril, el cual fue degradado completamente después de 8 días a 1-naftol y metilamina. Sin embargo, se observó que el metabolito 1-naftol no es degradado por la bacteria (figura 9).

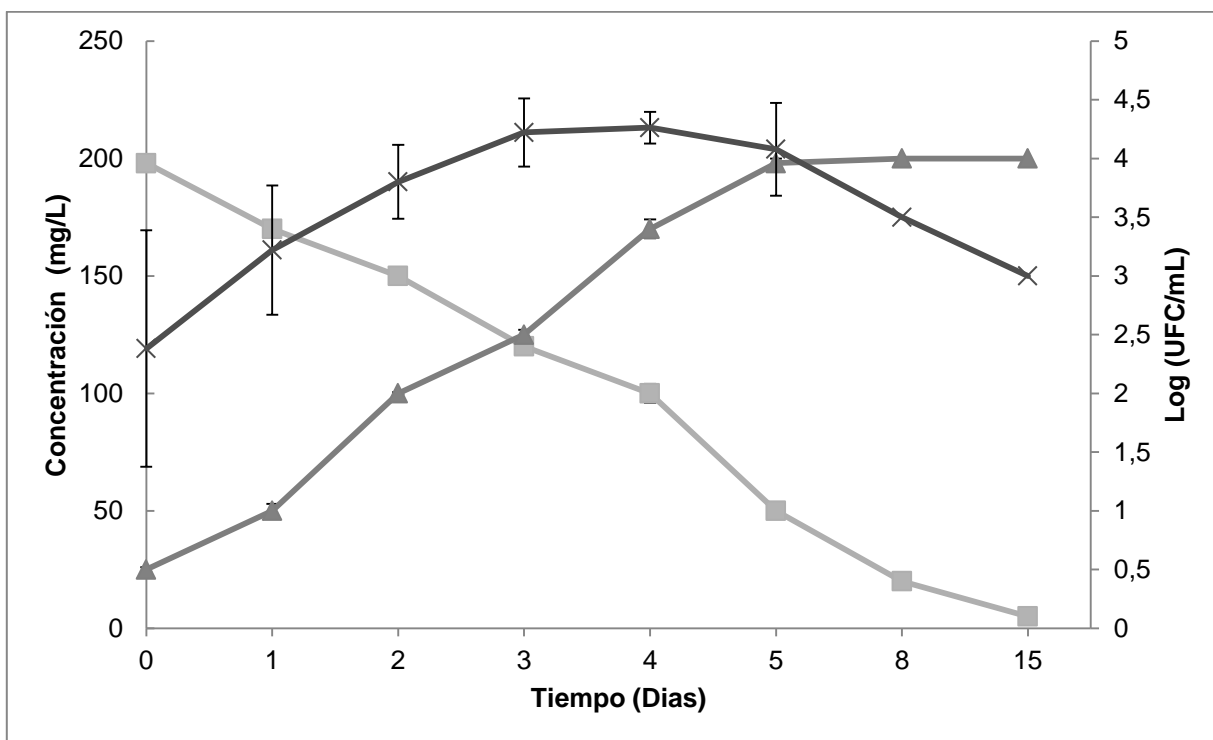


Figura 9. Biodegradación de carbaril (—■—) y 1-naftol (—▲—) utilizando HPLC-UV y crecimiento microbiano basado en logaritmo de UFC/mL (—×—). Los datos son el resultado del promedio de tres mediciones. Las barras verticales indican la \pm DS de tres réplicas.

3.4.2. BIODEGRADACIÓN DE 1-NAFTOL POR EL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC-UV)

Experimentos posteriores utilizando 1-naftol como única fuente de carbono en medio mínimo de sales minerales con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (MMS-1-naftol), comprobó lo anterior. Se pudo evidenciar que el aislamiento bacteriano S8-M3-13, es incapaz de crecer y de degradar el 1-naftol como fuente de carbono (tabla 7). No obstante, es capaz

de degradar el carbaril y crecer apartir de la metilamina como única fuente de carbono y nitrógeno, similar a la biodegradación de carbaril realizada por las bacterias *Aminobacter ciceronei* nov. ER2 (Topp *et al.*, 1993; McDonald *et al.*, 2005), *Pseudomonas* sp., 50581 (Chapalamadugu y Chaudhry; 1991).

Tabla 7. Degradación de 1-naftol por *Spingobium* sp. S8-M3-13 y crecimiento microbiano basado en el logaritmo de las UFC/mL, los datos son el resultado del promedio de tres mediciones. DS indica la desviación estándar de dos replicas.

Día	MMS-1-naftol	Promedio	DS	Promedio concentración	DS
		Ln UFC/mL	LnUFC/mL	1-naftol (mg/L)	1-naftol(mg/L)
1	Con bacteria	0	0	98	0.22
	Sin bacteria	0	0	95	0.45
8	Con bacteria	0	0	96	0.3
	Sin bacteria	0	0	92	1.0

Ln= Logaritmo natural, DS= Desviación Estandar, UFC=Unidades formadoras de colonias. Fuente: Autores.

Estudios realizados por Chapalamadugu y Chaudhry 1991, mencionan que el 1-naftol es mucho más tóxico que el carbaril, por lo tanto se sugiere la construcción de consorcios microbianos para llevar a cabo la metabolización completa del carbaril y llevar a cabo de desintoxicación de plaguicidas donde exista residualidad.

Se han descrito bacterias involucradas en la degradación completa de la estructura del anillo aromático del carbaril, que involucran la degradación del metabolito intermediario 1-naftol. Estudios realizados por Larkin y Day; 1986 en donde aislaron *Pseudomonas* sp. 12043 y *Rhodococcus* sp. 12038, demostraron que a pesar de degradar y crecer lentamente apartir de carbaril como fuente de carbono y nitrógeno, ambos aislamientos, utilizaron 1-naftol como única fuente de carbono. También demostraron que *Pseudomonas* sp. 12043 y *Rhodococcus* sp. 12038 fueron capaces de metabolizar 1-naftol a través de la vía del ácido salicílico y del ácido gentísico, provocando una mayor expresión de las enzimas en esta ruta.

Estudios realizados por Doddamani y Ninnekar, 2001, aislaron *Micrococcus* sp a partir de suelos contaminados con carbaril por la técnica de cultivo enriquecido en medio mineral Seubert, que contiene carbaril (0.2% p/v) como única fuente de carbono. El microorganismo fue capaz de utilizar carbaril como única fuente de carbono y la bacteria degradó carbaril por hidrólisis generando los intermediarios metabólicos: 1-naftol y metilamina. También se demostró que 1-naftol lo metaboliza adicionalmente a través de la ruta metabólica de salicilato, vía gentisato, como se evidencia en la absorción de oxígeno y de estudios enzimáticos. *Micrococcus* sp, también utiliza carbofuran, naftaleno, 1-naftol, y varios otros compuestos aromáticos como sustratos de crecimiento.

Estudios relacionados con *Sphingomonas* sp., S8-M3-13, evidencian degradación de carbofuran y su producto hidrolítico denominado carbofuran 7-fenol, produciendo metabolitos de color rojo (Castellanos *et al.*, 2013 b.). En los experimentos realizados para la biodegradación de carbaril con esta bacteria, no se evidenció cambio de coloración en el medio de cultivo. Estudios relacionados con *Sphingomonas* sp., evidencian que esta bacteria además de degradar los plaguicidas N-metilcarbamatos, carbaril y carbofuran, también posee la capacidad para degradar otros plaguicidas y compuestos aromáticos como, propoxur, aldicarb, gentisato y ácido procatecoico. (Feng *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006). Es posible que *Sphingobium* sp., S8-M3-13, degrade otros compuestos aromáticos relacionados.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El análisis filogenético del aislamiento bacteriano S8-M3-13 sumado a las características fisiológicas y morfológicas, nos indican que pertenece al género *Sphingobium* sp., género estrechamente relacionado con *Sphingomonas* sp., como anteriormente fue descrito por Castellanos y colaboradores 2013, con el análisis molecular DNAr 16S se concluye que podría tratarse de una nueva especie, se recomienda realizar análisis bioquímicos y moleculares como contenido de guaninas y citosinas, ubiquinona 10, perfil de ácidos grasos, contenido de poliaminas, entre otros, como estudios complementarios para reportarla como nueva especie.

Sphingobium sp., degrada carbaril hasta 1-naftol y metilamina, podríamos decir que la bacteria crece lentamente a partir de la metilamina producida por la hidrólisis de carbaril como fuente de carbono y nitrógeno, no obstante, no puede degradar el 1-naftol como fuente de carbono.

Se recomienda evaluar la biodegradación de otros plaguicidas y compuestos aromáticos por parte de *Sphingobium* sp., S8-M3-13 con el fin de determinar su uso potencial en la biorremediación de compuestos tóxicos en diferentes ambientes.

5. BIBLIOGRAFÍA

Agriculture and Agri-food Canada. 1997. Agriculture in harmony with nature: Strategy for environmentally sustainable Agriculture and Agri-Food Canada development in Canada. <http://www.agr.ca/policy/envharmon/docs/strate.pdf>. Consultado el 15 Febrero 2015.

Ahmad, R., Kookana, R.S., Megharajan, A.M & Alston., A. 2004. Again reduces the bioavailability of even a weekly sorbed pesticide Carbaryl in soil. *Environ.Toxicol. Chem.* 23(9): 2084-2089.

Aly, D.M & El-Dib M.A. 1971. Studies on the persistence of some carbamate insecticides in the aquatic environment. Hydrolysis of sevin, baygon, pyrolan and dimetilan in water. *Water Res.* 5(12): 1191-1205.

Atrevi, H., Smith, N & Chaudhry, Q. 2002. Exploiting microbes and plants to clean up pesticide-contaminated environments. *Pesticide Outlook*. DOI 10.1039/b200937b.

Back, R.C.1965.Significant developments in eight years with Sevin insecticide, *J. Agr. Food Chem.* 13(3): 198-199.

Bollag, J.M & Liu, S.Y. 1971. Degradation of sevin by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 3(3): 337-345.

Bonner, M.R., Lee W.J & Sandler D. 2005. Occupational exposure to Carbofuran and the incidence of cancer in the agricultural health study. *Environ. Health. Perspect.* 113(3):285–289.

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes de la República Argentina). 1995. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina, Buenos Aires. 891 pp.

Castellanos, R.J., Sánchez, N.J., Uribe, D., Moreno, L & Melgarejo, L.M. 2013a. Characterization of Carbofuran degrading bacteria obtained from potato cultivated soils with different pesticide application records. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 66(1): 6899-6908

Castellanos, R. J., & Rache L. 2013b. Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas n-metilcarbamatos. *Rev Int. Contam. Ambie*. 29 (Número especial sobre plaguicidas) 105-119.

Castillo, F & Roldán, M.D. 2005. *Biotecnología ambiental*. Editorial Tebar. Madrid, 614 pp.

Castro, R. 2003. Evaluación del efecto residual de la aplicación de plaguicidas N-Metilcarbamatos en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), variedad parda pastusa en Cundinamarca y Boyacá. Tesis para optar el título de Magister en química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 113p.

Cebrian, C., Andreu, E.S & Fernando, M.D. 1988. Degradation and acute toxicity of methidathion and trichlorfon on *Procambarus clarkii*, in experimental conditions. *Toxicol. Environ. Chem*. 31(32):321–327.

Chaudhry, G.R & Ali, A.N. 1988. Bacterial metabolism of Carbofuran. *Appl. Environ. Microbiol*. 54(1):1414-1419.

Chapalmadugu, S & Chaudhry, G.R. 1991. Hydrolysis of Carbaryl by *Pseudomonas* sp. and construction of a microbial consortium that completely metabolizes Carbaryl. *Appl. Environ. Microbiol*. 57(1): 744-750.

Cranmer, M.F. 1986. Carbaryl a toxicological review and risk analysis. *Neurotoxicology* 7(1): 247-328.

Derbyshire, M.K., Karns, J.S., Kearney, P.C & Nelson, J.O. 1987. Purification and characterization of an N-methylcarbamate pesticide-hydrolyzing enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 35(1):871-877.

Desaint S.A., Hartmann, N., Parekh, H. & Fournier, J. C. 2000. Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 34 (2): 173 - 180.

Doddamani, H.P & Ninnekar, H. 2001. Biodegradation of carbaryl by a *Micrococcus* species. *Curr. Microbiol.* 43 (1): 69-73.

Dong, H.S., Kim, D.U., Seong, C.N., Seong, C.N., Song, H.G & Ka, J.O. 2012. Genetic and phenotypic diversity of carbofuran-degrading bacteria isolated from agricultural soils. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (4): 448-456.

Dua, Y., Singh, A., Sethunathan, N.Y. & Jahri, A. 2002. Biotechnology and bioremediation success and limitations. *Appl Microbiol Biot.* 59(2-3): 143-152.

Durkin, P.R & King, C. 2008. Carbaryl human health and ecological risk assessment revised final report. Syracuse environmental research associates, Inc. USDA forest service contract. <http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/052-01-05aCarbaryl.pdf>. Consultado el 20 Febrero 2015.

Eisler, R. 1985. Carbofuran Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.* 85(13): 13-36.

Felsot, A., Maddox, J.V & Bruce, W. 1981. Enhanced microbial degradation of Carbofuran in soils with histories of Furadan use. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26(1): 781-788.

Feng, X., Ou, L.T & Ogram, A.V. 1997. Plasmid-mediated mineralization of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06. *Appl environ Microbiol.* 63(8): 1332–1337.

FINAGRO, 2009. En http://www.finagro.com.co/html/i_portals/index.php. Consultado el 28 de Noviembre del 2013.

Fredrickson, J., Balkwill, D., Drake, G., Romine, M., Ringelberg, D & White, D. 1995. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Appl Environ Microbiol.* 61(5): 1917 – 1922.

Getzin, L.W & Shanks, J.R. 1990. Enhanced degradation of Carbofuran in Pacific Northwest soils. *J. Environ. Sci. Health.* 25(1): 443-446.

Gilpin, A. 1996. *Dictionary of Environment and Sustainable Development*, Chichester: John Wiley and Sons. 15 (1): 332-339.

Goodman, L.R, Hansen. D. J., Manning, C.S & Favas, L.F. 1982. Effects of kepineon the sheeps head minnow in an entire life cycle toxicity test. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11(1): 335-337.

Guerrero, J. A. 2003. Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. *Agronomía Colombiana.* 21(3):198-209.

Gunasekara, A.S., Alrubin, K.S., Goh, F.C. Spurlock, J & Tjeerdema, R.S. 2008. Environmental fate and toxicology of carbaryl. En: M. Whitacre (ed.) *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 196. 12(2): 145-248.

Hanazato, T & Yasuno, M. 1989. Effects of Carbaryl on the spring zooplankton communities in ponds. *Environ. Pollut.* 56(1):1-10.

Harris, C.R., Chapman, R.A., Harris, C & Tu, C.M. 1984. Biodegradation of Pesticides in Soil: Rapid Induction of Carbamate Degrading Factors after Carbofuran Treatment. *Journal of Environmental Science and Health*, 34 (3):1112-1119.

Hashimoto, M., Fukui, M., Hayano, K., Hayatsu, M. 2002. Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hydrolase gene (*cehA*) from *Rhizobium* sp. Strain AC100. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (3):1220-1227.

Hayatsu, M & Nagata, T. 1993. Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Blastobacter* sp. M501. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1): 2121-2125.

Hayatsu, M., Hirano, M. & Nagata, T. 1999. Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. Strain RC100. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (3):1015-1019.

Hill, R.H., Shealy, D.B., Head, S.L., Williams, C.C., Bailey, S.L & Gregg, M. 2000. Determination of pesticide metabolites in human urine using an isotope dilution technique and tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 19(5): 323- 329.

Howard, P.H. 1991. Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Pesticides. Lewis Publishers Inc., Chelsea, and MI. En: Kamrin, M.A. Pesticides profiles. Toxicity, Environmental Impact, and Fate. Lewis Publishers. En http://www.finagro.com.co/html/i_portals/index.php consultado el 22 de Enero del 2015.

Huong, V.T.L., Malimas, T., Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Loan, L.T.T., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2007. Identification of two isolates assigned to the genus *Gluconobacter* based on 16S-23S rRNA ITS restriction analysis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53 (2): 133-142.

Instituto Nacional De Salud. 2012. Programa De Vigilancia Epidemiológica de Plaguicidas Organofosforados y Carbamatos. 18 (20): 18-72

IPCS (International Programme on Chemical Safety). 1994. Environmental Health Criteria 153. Carbaryl. World Health Organization. Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc153.htm>. Consulta el 21 de enero de 2015.

Johnson, D.P & Stansbury, H.A. 1965. Adaptation of sevin insecticide (carbaril) residue method to various crops. J. Agric. Food Chem. 13 (3): 235-238

Jorsaraei, A., Maliji, G., Azadmehr, A., Moghadamnia, A & Faraji, A. 2014. Immunotoxicity effects of carbaryl *in vivo* and *in vitro*. Environ. Toxicol. Chem. 38(3):838-844.

Jouanneau, Y & Meyer, C. 2006. Purification and Characterization of an Arene CisDihydrodiol Dehydrogenase Endowed with Broad Substrate Specificity Toward Polycyclic Hydrocarbon Hydrodiols. Appli. Environ. Microbiology. 72(7): 426-434.

Karns, J.S & Tomasek, P.H. 1991. Carbofuran hydrolase purification and properties. J. Agric. Food Chem. 39(1): 1004-1008.

Kaufman, D.D. 1967. Degradation of Carbamate herbicides in Soil. J. Agr. Food Chem. 15(4): 582-591.

Kazano, H.P., Kearney, C & Kaufman, D.D. 1972. Metabolism of methylcarbamate Insecticides in soil. J. Agr. Food Chem. 2(1): 975-978

Kim, I.S., Ryu, J.Y., Hur, H.G., GU, M.B., Kim, S.D., & Shim, J.H. 2004. *Sphingomonas* sp. Strain SB5 degrades carbofuran to a new metabolite by hydrolysis at the furanyl ring. J. Agric. Food. Chem. 52 (8): 2309–2314.

Koshlukova, S.E & Reed, N.R. 2014. Carbaryl. Encyclopedia of Toxicology. Elsevier. 668-672.

Larkin, M.J & Day, M.J. 1986. The metabolism of Carbaryl by three bacterial isolates, *Pseudomonas* sp. (NCIB 12042 and 12043) and *Rhodococcus* sp. (NCIB 12038) from Garden Soil. J. Appl. Bacteriology. 60(1): 233-242.

Lartigues, S.B & Garrigues, P.P. 1995. Degradation kinetics of organophosphorus and organonitrogen pesticides indifferent waters under various environmental conditions. Environ. Sci. Technol. 29(5): 1246-1254.

Madigan, M.T., Martinko, J.M & Parker, J. 2002. Brock biology of microorganism's 10^oedition. Prentice Hall, Iberia. Madrid. 986p.

Martin, J.D., Crowford, C.G & Larson, S.J. 2003. Pesticides in streams preliminary results from cycle I of the national water quality Assessment program (NAWQA), 9^o edition. Prentice Hall, Iberia. Madrid.1992p.

McDonald I., Kämpfer P., Topp E., Warner K.L., Cox M.J., Connell T.L., Miller L.G., Larkin M.J., Ducrocq V., Coulter C., Harper D.B., Colin M.J. & Oremland R.S. (2005). *Aminobacter ciceronei* sp. Nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. Nov., isolated from various terrestrial environments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55(1): 1827-1832.

Mohammad, H & Landeros, F.J. 2007. Los Indicadores Biológicos en la Evaluación de la Contaminación por Agroquímicos en Ecosistemas Acuáticos y Asociados. En http://www.mohammad.com.co/html/i_portals/index.php consultado el 7 de Enero del 2012

Moreno, M. 2002. Desarrollo de un inmunoensayo multianalito, basado en anticuerpos monoclonales, para la determinación de plaguicidas N-metilcarbamatos en frutas y hortalizas. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas. Universidad Politécnica de Valencia. 131p.

- Naqvi, T.A., Kanhar, N.A., Shar, A.H., Hussain, M & Ahmed, S. 2011. Microcosm studies for the biodegradation of Carbaryl in soil. *Pakistan J. Bot.* 43(2): 1079-1084
- Nivia, E., Sánchez, L & Nivia, M. 2000. *Mujeres y Plaguicidas*. Primera Edición: Palmira, Colombia.
- Nogueira, J.M.F., Sandra, T & Sandra, P. 2003. Considerations on ultra trace analysis of carbamates in water samples. *J. Chromatogr.* 996, 133-140.
- Ogram, A.V., Duan, Y.P., Trabue, S.L., Feng, X., Castro, H & Ou, L.T. 2000. Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32(3): 197-203.
- Ou, L.T., Gancaiz, D.H., Wheeler, W.B., Rao, P.S.C & Davidson, J.M. 2001. Influence of soil temperature and soil moisture on degradation and metabolism of Carbofuran in soils. *J. Environ. Qual.* 11(2): 293-298.
- Parekh, N.R & Suett, D.L. 1994. Carbofuran degrading bacteria from previously treated field soils. *J. Bacteriol.* 76(1):559-567.
- Park, Mr., Sunwoo, L., Tae-Ho, H., Byung, O., Jae, Hs & Indigan, S.K. 2006. A new intermediate in the degradation of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain SB5. *J. Microbiol Biotech.* 16(8):1306 - 1310.
- Parkin, T.B & Shelton D.R. 1994. Modeling Environmental Effects on Enhanced Carbofuran Degradation. *Pesticide Science.* 40(2):163-168

Pohlenz, H.D., Boidd, W., Sehuttke & Streber, W. 1992. Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* p52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene. J.Bacteriol. 174(1): 6600-6607.

Rajagopal, B.S., Chendrayan, K., Reddy, B.R & Sethunathen, N. 1983. Persistence of Carbaryl in flooded soils and its degradation by soil enrichment cultures Plant Soil. 73(1): 35-45.

Rajagopal, B.S., Brahma Prakash, G.P., Reddy, B.R., Singh, U.D & Sethunathan, N. 1984. Effects and persistence of selected carbamate pesticides in soil. Residue Rev. 93(1): 1-199.

Ramanand, K & Panda, S. 1988. Mineralization of Carbofuran by a Soil Bacterium. Appl. Environ and Microbiol. 54(1):2129-2133.

Ramírez, J.A & Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch Prev Riesgos Labor. 4(2):67-75.

Rangaswamy, J.R., Vijayshankar, Y.N., & Prakash, S.R. 1976. A simple spectrophotometric method for the determination of carbofuran residues. Journal of the AOAC. 59(6):1276-1278.

Rodríguez, A. 1996. Consideraciones al manejo de plagas y enfermedades de la papa en Colombia. En: Papas Colombianas con el Mejor Entorno Ambiental, Editorial Comunicaciones y Asociados-Fedepapa. 122-126pp.

Sato, H., Takeuchi, T & Sakai, K.L. 1999. Temporal cortex activation during speech recognition an optical topography study cognition. 73(2): 55-66.

Scow, K.M., Merica, R.R & Alexander, K. 1990. Kinetic analysis of enhanced biodegradation of Carbofuran. J.Agric.Food Chem. 38(1):908-912.

Solbio, S.A. 2006. Biorremediación utilizando microorganismos de acción dirigida. <http://www.solbio.com/Soluciones.asp?seccion=Hidrocarburos%20en%20suelos>. Consultado el 27 de Noviembre del 2012.

Stewart, N.E., Millemann, R.E & Breese, W.P. 1967. Acute toxicity of the insecticide Sevin and its hydrolytic product 1-naphthol to some marine organisms. *Trans. Am. Fish. Soc.* 96 (3):25-116.

Stolz, A. 2009. Molecular characteristics of xenobiotic degrading *Sphingomonas*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (5): 793-811.

Sudy, R.K., Sud, A.K & Gupta, G. 1972. Degradation of Sevin (1-Naphthyl-N-methyl carbamate) by *Achromobacter* sp. *Arch.Microbiol.* 87(1):353-358.

Swetha, V & Phale, P.S. 2005. Metabolism of Carbaryl via 1,2-Dihydroxynaphthalene by Soil Isolates *Pseudomonas* sp. Strains C4, C5, and C6. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10): 5951-5956.

Swetha, V & Phale, P.S. 2007. Purification and Characterization of 1-Naphthol-2-Hydroxylase from Carbaryl-Degrading *Pseudomonas* Strains C4. *J. Bacteriol.* 45 (10):2660-2666.

Tomasek, P.H., & Karns, J.S. 1989. Cloning of a carbofuran hydrolase gene from *Achromobacter* strain WM111 and its expression in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 171 (1):4038-4044.

Topp, E., Hanson, R.S., Ringelberg, D.B., White, D.C & Wheatcroft, R. 1993. Isolation and characterization of an N-methylcarbamate insecticide-degrading methylotrophic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (10):3339-3349.

Turco, R.F & Konopka, A. 1990. Biodegradation of Carbofuran in enhanced non-enhanced soils. *Soil. Biol. Biochem.* 22(1):195-201.

Valencia, E. 2005. Determinación de residuos de N-metilcarbamatos en fresa (*Fragaria* sp.) y evaluación de la adsorción-desorción de ^{14}C -carbofuran en suelos del mismo cultivo. Título para optar al título de Magister en Ingeniería química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p 16-28.

Venkateswarlu, K., Chendrayan, K & Sethunathan, N. 1980. Persistence and biodegradation of carbaryl in soils. *J. Environ. Sci. Health*, 15B: 421-429.

Wu, C., Liu, X., Wei, D & Fan, J. 2004. Photonochemical degradation of organic matter in water. *Water Res.* 35(16):3927–3933.

Wu, J., Hong, Q., Chen, Yn & Li, S. 2006. Analysis of the degrading products of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. with GC/MS and GC/FTIR. *Spectrosc Spect Anal.* 26(5): 1716 – 1719.

Yan, Q., Hong, Q., Han, P., Dong, X., Shen, Y & Li, S. 2007. Isolation and characterization of a carbofuran degrading strain *Novosphingobium* sp. *Fems Microbiol. Lett.* 271(8): 207-213.

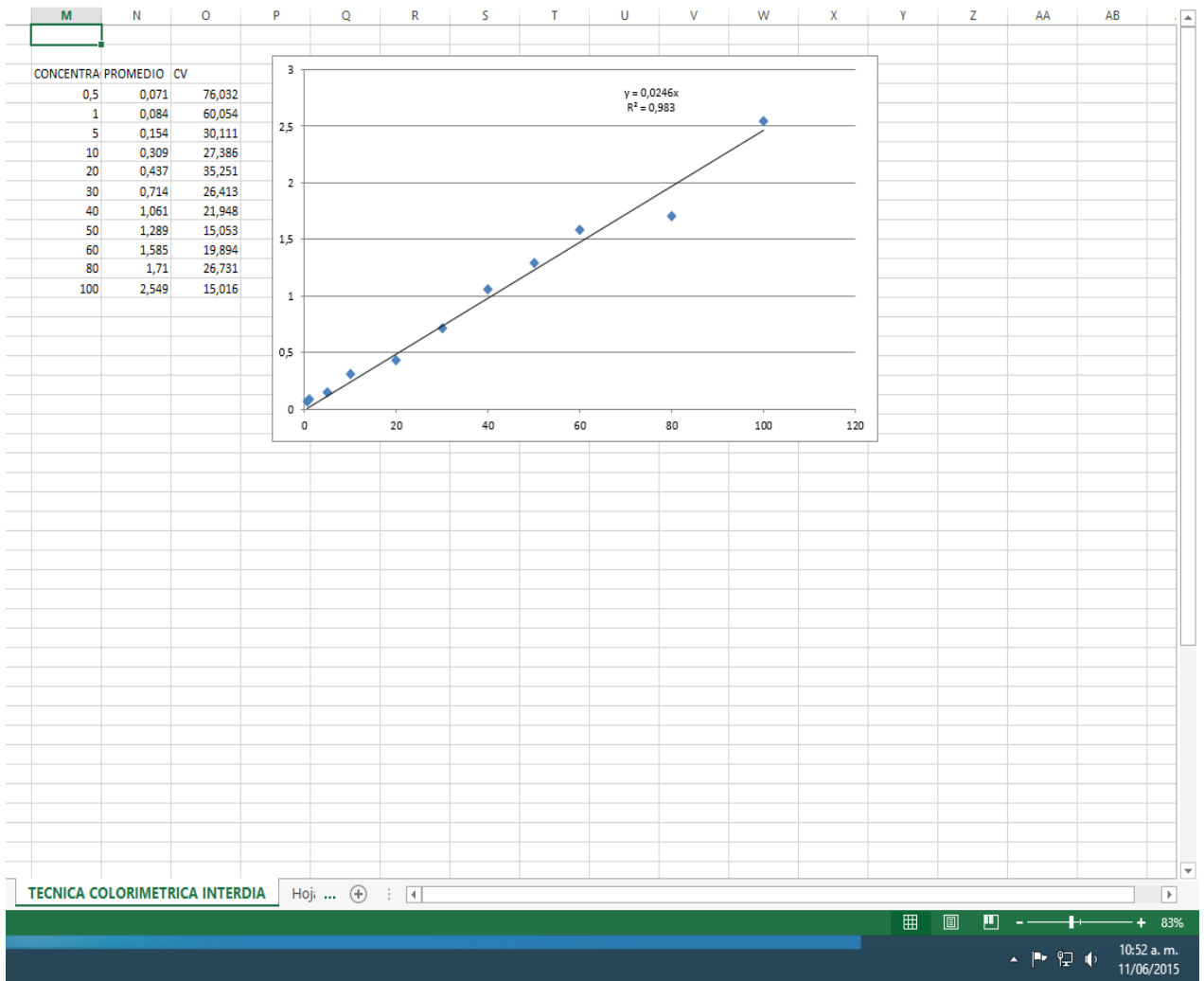
Zhelev, I.Z., Vrabcheva, V.G & Yotsev, M.T. 2004. Spectrophotometric determination of the carbamate insecticide carbofuran in Biological specimens. *BJVM.* 7 (1):3-18.

6. ANEXOS

6.1 CURVA DE REGRESIÓN MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO

Dividir Ver en paralelo
 Ocultar Desplazamiento sincrónico
 Mostrar Restablecer posición de la ventana

Cambiar ventanas
 Macros



6.2 ENSAYO INTRADÍA MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO

CARBARIL VARIOS EXPER. TEC. COLORIMETRICA 10 de abril 2015 - F

ARCHIVO INICIO INSERTAR DISEÑO DE PÁGINA FÓRMULAS DATOS REVISAR VISTA

Normal Ver salt. Diseño Vistas Regla Barra de fórmulas Líneas de cuadrícula Títulos

Vistas de página personalizadas Vistas de libro Mostrar

Zoom 100% Ampliar selección Nueva ventana Organizar todo Inmovilizar Ocultar Mostrar Dividir Ver en paralelo Desplazamiento sincrónico Restablecer posición de la ventana

E16 : X ✓ fx =PROMEDIO(B16:D16)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R			
1																					
2																					
3																					
4	1	0,062	0,081	0,123	0,0886667				3,5897436									1	4,0845704	1,5150481	37,091981
5		0,083	0,121	0,143	0,119				4,8178138									5	0,0127	0,04	3,46
6		0,121	0,129	0,139	0,133	0,1135556	0,0226626	19,96	5,3846154	4,5973909	0,9175134	19,957263						30	26,94257	0,6695908	2,4852522
7	5								0									60	58,732943	2,3070843	3,9280923
8									0												
9									0												
10	30	0,690	0,636	0,679	0,6683333				27,05803												
11		0,718	0,665	0,634	0,6723333				27,219973												
12		0,650	0,651	0,712	0,671	0,6705556	0,0020367	0,3037333	27,165992	27,147998	0,0824575	0,3037333									
13	60	1,380	1,408	1,385	1,391				56,315789												
14		1,413	1,441	1,328	1,394				56,437247												
15		1,369	1,423	1,408	1,4	1,395	0,0045826	0,3285	56,680162	56,477733	0,1855294	0,3285									
16	1	0,061	0,059	0,121	0,0803333				3,2523617												
17		0,053	0,049	0,143	0,051				2,0647773												
18		0,066	0,044	0,045	0,045	0,0587778	0,0189072	32,167226	1,8218623	2,3796671	0,7654729	32,167226									
19	5								0												
20									0												
21									0												
22	30	0,666	0,706	0,677	0,683				27,651822												
23		0,651	0,606	0,697	0,6513333				26,369771												
24		0,689	0,708	0,710	0,7023333	0,6788889	0,0257473	3,7925717	28,434548	27,48538	1,0424028	3,7925717									
25	60	1,691	1,412	1,508	1,537				62,226721												
26		1,410	1,487	1,412	1,4363333				58,151147												
27		1,432	1,532	1,696	1,5533333	1,5088889	0,0633634	4,1993445	62,887989	61,088619	2,5653216	4,1993445									
28	1	0,145	0,180	0,062	0,129				5,2226721												
29		0,161	0,132	0,097	0,13				5,2631579												
30		0,162	0,148	0,086	0,132	0,1303333	0,0015275	1,1720142	5,3441296	5,2766532	0,0618431	1,1720142									
31	5								0												
32									0												
33									0												
34	30	0,683	0,601	0,648	0,644				26,072874												
35		0,691	0,682	0,616	0,663				26,842105												
36		0,665	0,633	0,604	0,634	1,0476111	0,0147309	1,4061439	25,668016	26,194332	0,5963935	2,2768037									
37	60	1,435	1,457	1,358	1,4166667				57,354926												
38		1,506	1,459	1,429	1,4646667				59,298246												
39		1,507	1,428	1,455	1,4633333	1,4482222	0,027336	1,8875586	59,244265	58,632479	1,1067224	1,8875586									
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

TECNICA COLORIMETRICA INTRADIA TECNICA COLORIMETRICA INTERDIA datos 26 de junio del 2014 Cinética de Biodegr carbaril Hoja2 Hoja ...

LISTO

6.3. ENSAYO INTERDÍA MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO

CARBARIL VARIOS EXPER. TEC. COLORIMETRICA 11

ARCHIVO INICIO INSERTAR DISEÑO DE PÁGINA FÓRMULAS DATOS REVISAR VISTA

Normal Ver salt. Diseño Vistas
Pág. de página personalizadas Vistas de libro

Regla Barra de fórmulas Líneas de cuadrícula Títulos

Zoom 100% Ampliar selección Nueva ventana Organizar todo Inmovilizar

Dividir Ocultar Ver en paralelo Desplazamiento sincr Restablecer posición c

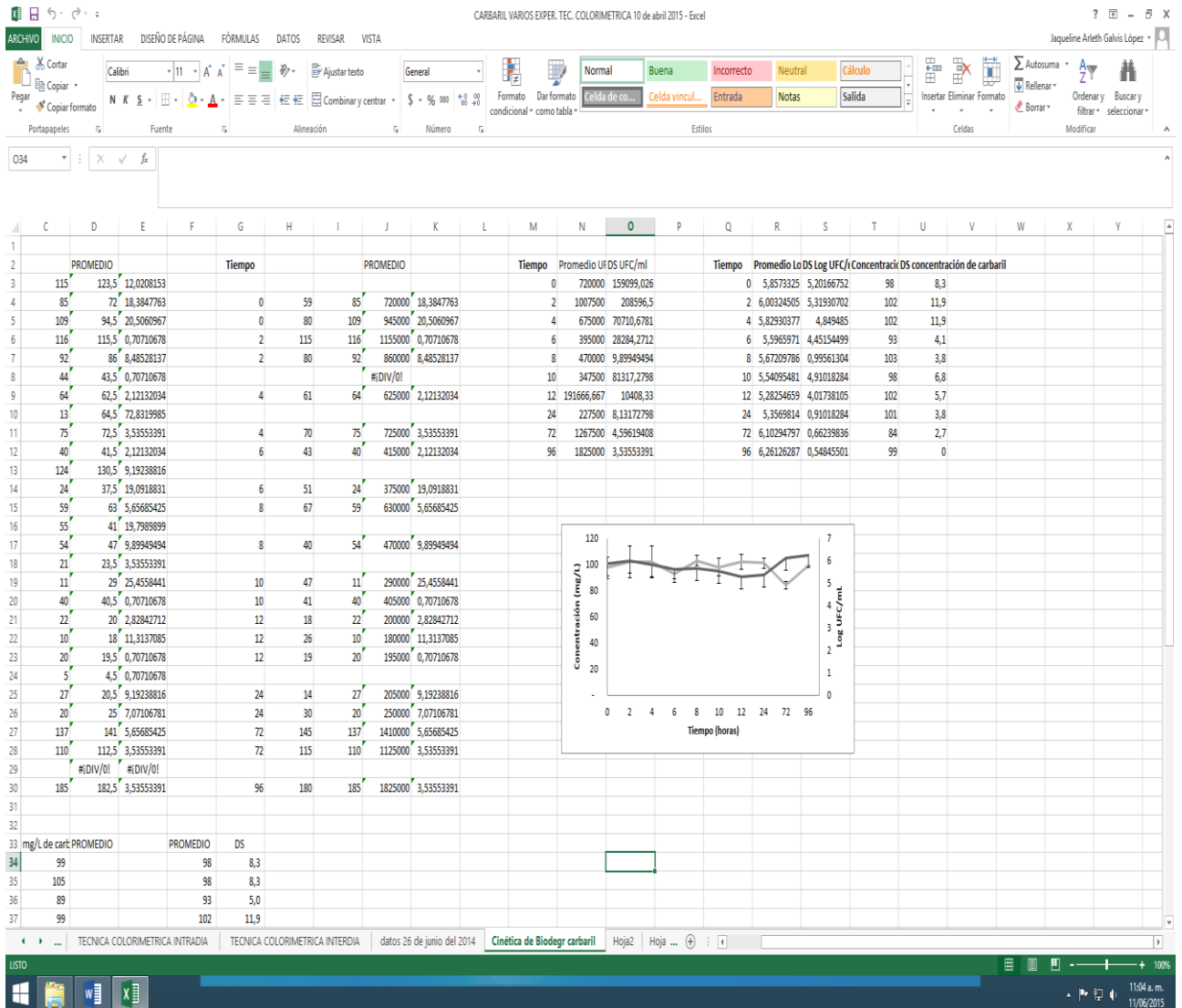
Ventana

R42

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
1	CURVA CARBARIL ENSAYOS JUNIO 2013																				
2	CONCENTRACIÓN ppm																				
3					MEDIA	PROMEDI	DESV	CV	PROMEDI	PROMEDI	DESV	COI	CV	CONCENTRACIÓ	CONCENT	PROMEDI	CV				
4	0,5			0,012	0,012				0,487805					0,5	0,071	76,032					
5				0,08	0,080				3,252033					1	0,084	60,054					
6		0,05	0,02	0,13	0,068				2,750678					5	0,154	30,111					
7		0,01	0,02	0,02	0,019				0,785908					10	0,309	27,386					
8		0,13	0,12	0,121	0,122	0,060	0,046	75,592	4,9729	2,449864	1,851898	75,59184		20	0,437	35,251					no tomar estos datos
9	1								3,943089					30	0,714	26,413					
10			0,09	0,101	0,097				5,01355					40	1,061	21,948					
11		0,12	0,13	0,121	0,123				4,322493					50	1,289	15,053					
12		0,10	0,11	0,108	0,106				5,352304					60	1,585	19,894					
13						0,109	0,013	12,261	4,426378	0,542739	12,26147			80	1,71	26,731					
14	5	0,12	0,14	0,135	0,132				5,121951					100	2,549	15,016					
15		0,12	0,12	0,135	0,126																
16																					
17																					
18		0,13		0,116	0,123	0,127	0,004	3,469	5,159085	0,17891	3,468529										
19	10	0,22	0,26	0,255	0,244				9,932249												
20				0,405	0,405				16,46341												
21		0,31	0,32	0,314	0,314				12,76423												
22		0,22	0,22	0,214	0,217				8,834688												
23		0,27		0,333	0,303	0,297	0,073	24,482	12,31707	12,06233	2,95305	24,48159									
24	20																				
25		0,31	0,37	0,231	0,304				12,34417												
26		0,20	0,36	0,396	0,317				12,87263												
27		0,36	0,38	0,373	0,372				15,12195												
28				0,489	0,489				19,87805	15,0542	3,434026	22,81108									
29	30					0,370	0,084	22,811													
30		0,69		0,642	0,666				27,07317												
31		0,67	0,62		0,645				26,21951												
32																					
33						0,656	0,015	2,265	26,84634	0,603628	2,265331										
34	40								0												
35		0,88	0,86	0,88	0,872				35,4336												
36		1,04		0,73	0,884				35,91463												
37		0,84	0,95	0,875	0,890				36,16531												
38				0,945	0,945				38,41463	29,18564	16,35549	56,03952									
39	50	1,16	1,49	1,422	1,357				55,1626												
40				1,224	1,224				49,7561												
41		1,29	1,47		1,380				56,07724												
42		1,15	1,49	1,198	1,279				51,99187												
43				1,304	1,304	1,309	0,062	4,745	53,00813	53,19919	2,52424	4,744884									
44	60																				
45																					
46		1,48		1,27	1,373				55,81301												
47				1,273	1,273				51,74797												
48		1,44				1,323	0,071	5,345	53,78049	2,874418	5,344722										
49	80	1,45	1,44	1,403	1,432				58,19783												
50		1,93	2,40	1,27	1,867				75,88076												
51		1,46	1,44	1,408	1,436				58,37398												
52		1,72	1,17	1,209	1,368				55,62331												
53		2,70	2,56	2,078	2,446	1,710	0,457	26,731	99,43089	69,50136	18,57863	26,73132									
54	100	2,98	3,10	2,99	3,023				122,8997												
55		2,46	2,59	2,54	2,530				102,8455												
56		2,79	2,08	3,339	2,736				111,2331												
57		2,04	2,03	1,883	1,984				80,65041												
58		2,36	2,59	2,46	2,470	2,549	0,383	15,016	100,4065	103,607	15,55791	15,01627									

TECNICA COLORIMETRICA INTRADIA TECNICA COLORIMETRICA INTERDIA datos 26 de junio del 2014 Cinética de Biodegr carbaril Hoja2

6.4. BIODEGRADACIÓN DE CARBARIL POR EL MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO



6.5 EXTRACCIONES CON CLOROFORMO

EXTRACCIONES TÉCNICA COLORIMETERI

ARCHIVO INICIO INSERTAR DISEÑO DE PÁGINA FÓRMULAS DATOS REVISAR VISTA

Calibri 11 Fuente Alineación Número

Normal Celda de co...

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1												
2	I	II	III			I EXTRACI	III EXTRACCI	VI EXTRACCI	ABS. ESPERADA 100 ppm	EXACTITUD	PRECISION	
3	2,568	2,663	2,745		PROMEDIO	2,543	2,638	2,694				
4	2,566	2,685	2,739		DESV. EST	0,042	0,063	0,084				
5	2,495	2,567	2,597									
6								absorbancia	concentracion			
7	1,396	1,435	1,404	46,18				2,745	90,29			
8	1,354	1,418	1,433	47,13				2,739	90,09			
9	1,473	1,479	1,495	49,17				2,597	85,42			
10	1,435		1,444	47,36	47,4933333				88,6			
11	1,418				1,52775434				2,755775753			
12	1,479											
13	1,404											
14	1,433											
15	1,395											
16	1,42077778											
17	0,03952144											
18					absorbancia	concentracion						
19	0,325				0,307	10,09						
20	0,335				0,309	10,16						
21	0,322				0,305	10,03						
22	0,206					10,0933333						
23	0,307					0,06506407						
24	0,307											
25	0,294											
26	0,298											
27	0,305											
28	0,29988889											
29	0,03763789											
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												

EXTRACCION TEC COLORIMETRICA CURVA 10.07.14 Hoja3

LISTO

6.6 BIODEGRADACIÓN DE CARBARIL POR MÉTODO HPLC (UV)

HERRAMIENTAS DE GRÁFICOS CINÉTICA CARBARIL 5 de marzo 2015 - Excel

ARCHIVO INICIO INSERTAR DISEÑO DE PÁGINA FÓRMULAS DATOS REVISAR VISTA DISEÑO FORMATO

Cortar Copiar Copiar formato Pegar Fuente Alineación Número Estilos

Calibrí (Cuerpo) 10 Ajustar texto General Formato Dar formato condicional como tabla

Normal Buena Incorrecto Neutra Celda de co... Celda vincu... Entrada Notas

1	A	B	C	D	E	F	G	H
	Tiempo (horas)	Promedio concentración de carbaril(mg/L)	DS concentración carbaril	promedio Log UFC/ml	DS log UFC/ml	Promedio concentración de 1-naftol (mg/L)	DS concentración de 1-naftol	
2	0	198	1	2,381372151	1,007206689	25	1	
3	1	170	3	3,220823597	0,550476611	50	1	
4	2	150	0,5	3,800873628	0,314223581	100	0,5	
5	3	120	2	4,22133855	0,289628074	125	0,7	
6	4	100	4	4,262090315	0,135881781	170	1,2	
7	5	50	2	4,078641941	0,395894771	198	1,5	
8	8	20	1	3,5	0,395894771	200		
9	15	5	1,3	3	0,395894771	200		

12	A	B	C	D
	Tiempo (horas)	Promedio concentración de carbaril(mg/L)	Promedio concentración de 1-naftol (mg/L)	promedio Log UFC/ml
13	0	198	25	2,381372151
14	1	170	50	3,220823597
15	2	150	100	3,800873628
16	3	120	125	4,22133855
17	4	100	170	4,262090315
18	5	50	198	4,078641941
19	8	20	200	3,5
20	15	5	200	3

