

Aislamiento, purificación y selección de bacterias como candidatos para ser utilizadas en procesos de biorremediación de Mancozeb (*ethylenebisdiathio carbamate*) utilizado en cultivos de papa¹

Miguel A. Piragauta A^{2, *},

Martha L. Mojica³ y Edgar G. Baquero⁴

Laboratorio de Microbiología Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Centro de investigaciones y Desarrollo Científico CIDC, Universidad Distrital FJC,

RESUMEN

De 28 muestras de suelo provenientes de cultivos de papa, se aislaron 69 colonias de bacterias diferentes en Caldo Nutritivo con Mancozeb (0,0625mg/ml). Las cepas aisladas, se cultivaron por 24h a 25 °C en caldo Sales, suplementado con fuentes de carbono (glucosa 0,1%), nitrógeno (nitrato de potasio 0,2%) o sin ellos y mancozeb (Dithane M45 NT) a concentraciones de 0.0625 mg/ml, seleccionando 3 cepas promisorias, las cuales fueron cultivadas en caldo SGNM por 72h. La cepa de *P. putida* presentó el mejor comportamiento en este medio de cultivo hasta las 72h, indicando posible uso del mancozeb como fuente adicional de carbono. La actividad biológica de la cepa de

¹ Proyecto Financiado por el Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico. Universidad Distrital Francisco José de Caldas

² M. Sc. Microbiología. Director del proyecto de investigación. Docente tiempo completo. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Proyecto Curricular de Tecnología en Saneamiento Ambiental. *Av. Circunvalar Venado de oro, Tel.3424706, mpiragauta@udistrital.edu.co

³ Ingeniera Sanitaria. Docente tiempo completo. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Proyecto Curricular de Tecnología en Saneamiento Ambiental.

⁴ Tecnólogo En Saneamiento Ambiental. Participo en el proyecto como pasante de investigación.

Pseudomonas putida sobre el mancozeb, se determinó utilizando una cepa de *Bacillus cereus* sensible al mancozeb como indicador de concentraciones residuales de mancozeb en los medios de digestión; se detectó que en 24 horas la cepa de *P. putida* con una población inicial de 10^6 células/ml, degradó el mancozeb de 0,0625mg/ml a 0,0025mg/ml. La rapidez de degradación del mancozeb con una población de *P. putida* baja, la presenta como promisoría para usos en biorremediación de suelos.

Palabras Clave:

Mancozeb control de *Phytophthora infestans*, biorremediación de pesticidas en cultivo de papa, *Pseudomonas putida*,

ABSTRACT:

69 colonies of different bacteria were isolated in culture medium with mancozeb (0.0625 mg/ml). They came from 28 samples of soil of potato crops. The isolated strains were cultivated for 24 hours at a temperature of 25°C in salts broth, which was supplemented with sources of carbon (glucose 0.1%), nitrogen (potassium nitrate 0.2%) or without them and also with mancozeb (Dithane M 45 NT) in concentration of 0.0625 mg/ml. Out of those 69 samples were selected and cultivated in this SGNM broth for 72 hours, indicating possible use of mancozeb as an additional source of carbon. The biological activity of the strain called *Pseudomonas putida* upon mancozeb was determined using a strain of *Bacillus cereus* sensitive to mancozeb as a indicator of residual concentration of mancozeb in the digestion means. It was detected that in 24h the strain *P. putida* with an initial population of 10^6 cells/ml degraded the mancozeb from 0.0625mg/ml. The speed of degradation of the mancozeb with low *P. putida* population makes it promising for use in bioremediation of soil.

Keywords:

Mancozeb, bioremediation of pesticide in potatoes crop, *Pseudomonas putida*, *Phytophthora infestans*

1. INTRODUCCIÓN

El mancozeb es un insecticida utilizado para el control de plagas que afectan cultivos, como el caso del hongo *Phytophthora infestans*, que causa la gota de la papa. En Colombia se usa en forma generalizada en las zonas de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y otros departamentos, donde el cultivo de papa es extensivo y se aplica varias veces en el año por ciclo de producción con una frecuencia de 7.2 (2 a 5 kg/ha), siendo de mayor intensidad en las épocas de lluvias (cada 7 a 10 días) (**FRENO y TÉLLEZ 1997; FEDEPAPA 1997; HOUETO AND HOFFMAN, 1995; CORPOICA, 2001**). Este fungicida es un carbamato y su compuesto activo es un producto polimérico de Manganeso etilen-1,2-bisditiocarbamato, en coordinación con iones de zinc, conocido en el comercio como: Dithane M 45, Dithane F-MB líquido, Manzate 200, Ridomil, Veranero, Vondoceb, Cursate M8 y Sandofan M10, Cobrethane, Curatane, Acrobat MZ, Mancozeb, Mancozin, Manzate 200, Manzeb, entre otros (**FEDEPAPA,**

1997]. A pesar de su clasificación toxicológica en categoría III por legislaciones flexibles y de bajo control en el mundo, existen referencias que reportan un alto riesgo de toxicidad aguda y crónica en animales experimentales (EXTOXNET, 1998) debido al metabolito Etilentiourea de toxicidad categoría I, carcinogénico, mutagénico y teratogénico presentando riesgos para la salud humana, de mamíferos en general y de peces (XU SUE, 2000; CALUMPANG, et. al., 1993). Al aplicarse por aspersión y debido a la alta incidencia de vientos en la región por deriva puede llegar a contaminar afluentes. En el suelo forma residuos no extractables, pero la etilentiourea se lixivia contaminando aguas subterráneas. En el tubérculo de la papa se han reportado residuos de mancozeb de 0,0233 ng/kg de papa (CORPOICA, 2001).

La permanencia del mancozeb en el suelo es de 1 a 7 días y la frecuencia de aspersión en muchos de los casos es cada 7 días en épocas de lluvia, razón por la cual es importante la búsqueda de biotransformadores de este compuesto para utilizarse como biorremediadores de suelos contaminados (CALUMPANG, et. al., 1993; CORPOICA, 2001; GONZALEZ, 2003.). Este reporte presenta los resultados de la búsqueda de bacterias aeróbicas heterótrofas provenientes de muestras de suelo de cultivo de papa de Cundinamarca y Boyacá que presentan actividad transformadora de mancozeb en cultivo líquido con medio mínimo y presencia de mancozeb a una concentración de 0.0625mg/ml. La detección de la actividad degradadora de una cepa de *Pseudomonas putida* se determinó indirectamente usando una cepa de *Bacillus cereus* sensible a mancozeb.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Consecución de muestras de suelo para aislamiento de microorganismos degradadores de mancozeb

Se colectaron 20 muestras de 500g cada una, provenientes de Zipaquirá en las veredas de Venta Larga, Río Frío, Páramo del Guerrero y Páramo Alto, municipio de Cogua y Villapinzón en Cundinamarca y 8 muestras en el municipio de Caldas, Boyacá. Las muestras se recolectaron hasta una profundidad de 10 cm con una pala metálica y se empacaron en bolsas plásticas estériles. Se transportaron en nevera de icopor hasta el laboratorio de microbiología y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

2.2 Aislamiento de bacterias en presencia de mancozeb

En una fiola con 99 ml de caldo nutritivo estéril y 0.0625 mg/ml de mancozeb fresco (Dithane M-45 NT al 80% de mancozeb) se disolvieron 11 g de muestra de suelo, se incubó a 25 °C con agitación constante en un agitador magnético (**Agitador Stirrer/ Hot plates CORNING**) con plancha de calentamiento a 170 rpm durante 48 h. Seguidamente se recolectó un inóculo de 100 µl y se extendió en la superficie de agar nutritivo en caja con asa de vidrio. Las cajas fueron incubadas a 25 °C por 48 horas en estufa (**BINDER**). A cada una de las colonias crecidas en estas cajas se les describió su morfología macroscópica y microscópica. Se realizó un tamizaje seleccionado las colonias con morfologías diferentes y se sembró utilizando la técnica de aislamiento

en placa de agar nutritivo con incubación a 25°C por 48 h. Las cepas puras se guardaron en nevera a 4°C.

2.3 Dinámica de crecimiento de las cepas 2-2, 6-3 y 8-3 en cultivo estático durante 72 horas en medio de cultivo SGNM.

De cultivos en Agar Nutritivo (AN) con las cepas 2-2, 6-3 y 8-3 que presentaron características promisorias como degradadoras de mancozeb (datos no mostrados) se tomaron alícuotas de 100 µl de cada una y por separado se sembraron en tubos con 9ml de de caldo de cultivo líquido:SGNM (**Cloruro de sodio 0,30%, cloruro de potasio 0,02%, sulfato de magnesio 0,01%, fosfato mono potásico 0,15%, fosfato dipotásico 0,40%, glucosa 0.1%, 0,2% de nitrato de potasio y 0,0625 mg/ml de mancozeb**) (Manual OXOID. 1995). Este primer tubo de cada una de las cepas se denominó como Tubo 1.

El Tubo 1, se incubó 24 horas a 25°C. Pasado el tiempo de incubación se realizó conteo directo en cámara de Neubauer y de este se pasaron 100 µl a otro tubo con 9 ml de SGNM (Tubo 2). Cuando el Tubo 1 completo 48 horas de incubación a 25°C nuevamente se realizó conteo directo y se sembró en 9ml de SGNM (Tubo3). Este proceso se repitió cuando el Tubo 1 completo 72 horas de incubación (Tubo 4). Los tubos marcados 2, 3 y 4 se incubaron por 24 horas a 25°C y se les realizó conteo directo en cámara de Neubauer. El control utilizado para este ensayo tuvo el mismo procedimiento pero el medio de cultivo usado fue SGN (SGNM sin Mancozeb).

2.4 Recuento directo de células en cámara de Neubauer.:

Para los conteos directos de células en cámara se sirvió una muestra de 10 µl. El número de células por unidad de área de la rejilla se contó directamente en el microscopio (40X). Se contaron las células presentes en cinco cuadrantes de 4X4, se sumó, promedió y multiplicó por 2.5×10^4 obteniendo el número de células/ml (BOWDEN, 1977)

2.5 Selección de cepas sensibles a mancozeb

2.5.1 Muestreo

Se tomaron 2 muestras cada una de 500g de suelo por medio de calicatas de 25 cm de longitud, 25 cm de profundidad y 25 cm de ancho, de la Vereda Cerezos Grandes "Cerro Bochica" municipio de Chipaque, Cundinamarca y se transportaron al laboratorio de microbiología en bolsas estériles y se refrigeraron a 4 °C hasta su uso

2.5.2 Aislamiento de bacterias y prueba de antibiósisis para selección de cepas sensibles a mancozeb

A 99 ml de caldo nutritivo estéril se le adicionaron 11g de muestra de suelo, se homogenizó la muestra y se sembró en agar nutritivo en caja, en dilución hasta 10^7 (9 ml de agua peptonada 0.1 %) las cajas se incubaron 24h a 25°C. Finalizado el tiempo de incubación se seleccionaron de las cajas con colonias separadas contables, 10 colonias de bacterias que presentaron morfologías macroscópicas y microscópicas diferentes.

Estas colonias se resembraron por aislamiento en cajas de agar nutritivo y se incubaron a 25 °C por 24h. En una caja de AN con Mancozeb al 0.0625 mg/ml y otra replica sin mancozeb se sembraron en la superficie una colonia de cada una de las 10 seleccionadas, en posición de acuerdo a una cuadrícula de 1 cm² en papel, la cual se colocó por debajo de las cajas como guía y en correspondencia con la replica. Estos cultivos se incubaron a 25 °C por 24h .

2.5.3 Tiempo de letalidad de la cepa de *Bacillus cereus* a una concentración de 0.0625mg/ml de mancozeb

Un inóculo de 10ml con 10⁷ células/ml cultivadas previamente por 24 h a 25 °C en un caldo mínimo esencial (SGP) (Cloruro de sodio 0.3% p/v, Cloruro de Potasio 0.02% p/v, Sulfato de Magnesio 0.01% p/v, Fosfato Monopotásico 0.15% p/v, Fosfato de Sodio Bibásico 0.4% p/v, Glucosa 1% p/v, Peptona 0.1% p/v), se sembraron por triplicado en tubos con 10 µl de medio de cultivo (SGP) suplementado con 0.0625mg/ml de mancozeb. Los tubos se incubaron durante 0, 1, 6 12 24 36 h a 25° C. Terminados los tiempos de incubación correspondientes, se homogenizaron los tubos en vortex y una alícuota de 100 ml se sembró en caja con agar nutritivo por duplicado, utilizando la técnica de recuento en placa en superficie (ICMSF, 1982). A los tubos control de prueba se les realizó el mismo procedimiento anterior pero no se uso suplemento de mancozeb. Finalmente se realizaron los respectivos conteos.

2.5.4 Comportamiento de la cepa de *Bacillus cereus* en SGP a diferentes concentraciones de mancozeb dosis letal 50 (dl50), dosis letal 90 (dl90) y dosis letal 100 (dl100)

Se prepararon 16 grupos de a tres tubos con 10 ml de SGP, 10⁶ células/ml de *Bacillus cereus* (proveniente de un cultivo en SGP de 24h a 25°C) y mancozeb en las siguientes concentraciones por grupo: 0.0625, 0.05, 0.0375, 0.0250, 0.0125, 0.01, 0.0095, 0.009, 0.0085, 0.0075, 0.005, 0.0035, 0.003, 0.0022, 0.0020, 0.0015 y 0,00 mg/ml. Todos los grupos de tubos fueron incubados a 25° C por 24 h. Finalizado el tiempo de incubación se sembró en agar nutritivo por duplicado las diluciones 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵, las cajas se incubaron 24h a 25°C (ICMSF, 1982). Terminado el tiempo de incubación se realizaron los correspondientes conteos de UFC.

2.5.5 Determinación indirecta de la degradación de mancozeb por hidrólisis en caldo de cultivo SGP usando como indicador la cepa de *Bacillus cereus* (E5).

Cuatro tubos con SGP y 0,0625 mg/ml de mancozeb cada uno fueron incubados a 25 °C por 24h, 48h, 96h y 120h, respectivamente, por triplicado. Después de incubación, cada uno de los tubos se inoculó con 10⁷ células de *Bacillus cereus*, cultivo fresco de 24 h en SGP. Se utilizó como control de crecimiento de la cepa de *Bacillus cereus*, 1 tubo con SGP y 10⁶ células/ml sin mancozeb. Una vez inoculados los tubos, se homogenizaron y se incubaron a 25°C durante 24h. Seguidamente se sembró en caja con agar nutritivo por duplicado en las diluciones 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² y se incubaron a 25°C durante 24h. Finalizado el tiempo de incubación se realizaron los correspondientes conteos.

2.5.6 Determinación de la Concentración Residual de Mancozeb por degradación biológica con la cepa 8-3 en Medio de Cultivo SM

Se prepararon 9 tubos cada uno con 10 ml de MS y 0,2% de nitrato de potasio, se les adiciono 0.0625 mg/ml de Mancozeb y se les inoculó 10^7 cel/ml de la cepa degradadora 8-3, en cada uno. Se incubaron 3 tubos por 0 h, 3 por 24h y los restantes 3 por 48 h a 25°C, respectivamente. Terminados los correspondientes tiempos de incubación se homogenizo el contenido de los cultivos, se pasó 1 ml de cada uno y se sirvió respectivamente en otros tubos que contenían 1 ml de caldo SGP estéril. A estos últimos tubos se les inoculó *Bacillus cereus*, proveniente de cultivo SGP fresco de 24h de incubación a 25 °C, para una concentración final por tubo de 10^6 células/ml. Se homogenizaron y se incubaron los tubos a 25 °C durante 24h. Cumplido el tiempo se sembró en cajas con agar nutritivo, por duplicado, diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Las cajas fueron incubadas a 25 °C por 24h y se realizaron los correspondientes conteos de UFC.

Adicionalmente se prepararon controles de antagonismos: A 3 tubos con 10 ml de MS y 0,2% de nitrato de potasio, se inocularon con 10^7 cel/ml de la cepa 8-3. Un tubo se incubó por 0 h, otro por 24h y el tercero por 48 h a 25°C. Luego de la incubación correspondiente se homogenizaron y de cada uno de estos se tomó un volumen de 1 ml dispensándolo por aparte en otros tres tubos que contenían 1 ml de medio SGP fresco; a estos últimos tubos se les adiciono 10 ml con una concentración de 10^7 células/ml de *Bacillus cereus* provenientes de un cultivo de 24h de incubación a 25°C. Se homogenizó la mezcla y se incubó por 24h a 25°C, finalizado el tiempo de incubación, se sembró por duplicado placas de AN con diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , seguidamente se realizó el correspondiente conteo de UFC.

Un control de viabilidad de la cepa E5 se preparó con el mismo procedimiento anterior sin inocular la cepa 8,3.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Selección de cepas

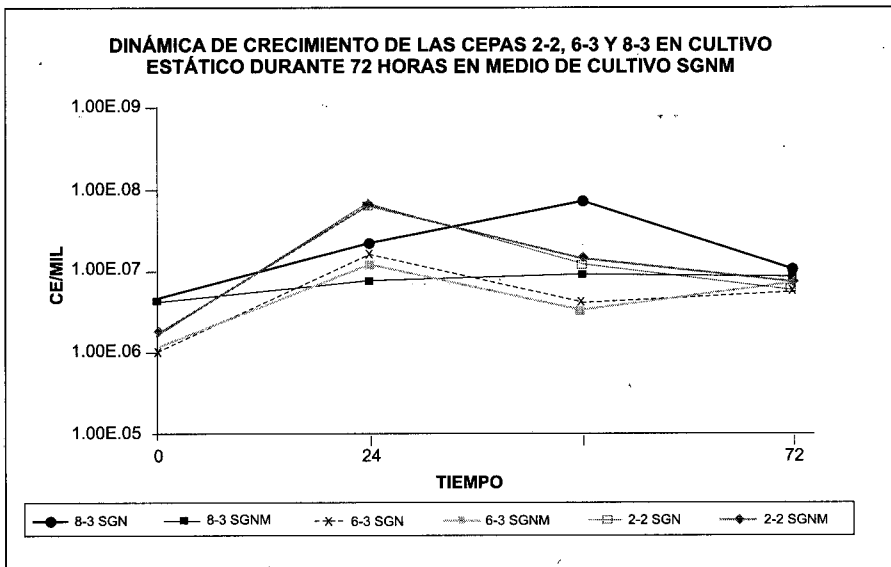
Las muestras de suelo provenientes de cultivos de papa se disolvieron en CN con mancozeb al 0.0625 mg/ml fresco, este método permitió la selección de 69 colonias de bacterias con morfologías macroscópicas diferentes que crecieron a 25 °C por 48h. No se presentó el crecimiento de hongos miceliales ni levaduras. Las colonias aisladas fueron sembradas en medio SGNM a 25 °C por 48h, este ensayo se realizó en este medio de cultivo para permitir analizar las condiciones de crecimiento con o sin fuentes de carbono (Glucosa 0,1%) y/o de nitrógeno (0,2% de nitrato de potasio) y en presencia o no de mancozeb. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas marcadas como 2-2, 6-3 y 8-3 presentaron las mejores dinámicas de crecimiento en estos medios de cultivo. (datos no mostrados). De acuerdo con estos resultados se decidió evaluar el comportamiento de las tres cepas en cultivo estático hasta las 72 horas de incubación utilizando SGNM como medio de cultivo, para conocer la respuesta de los microorganismos al proporcionarles una cantidad de 0.1% de Glucosa como fuente de carbono y 0.1% de Nitrato de potasio como fuente de nitrógeno, para así determinar si la población aumentaba una vez agotadas estas fuentes, que pueden ser consumidas en

18 horas aproximadamente según (TSI) (**Triple Sugar Iron**). (**Manual OXOID. 1995**) y así identificar cual de las tres cepas, una vez agotadas estas fuentes, es capaz de tomar el mancozeb como nutriente.

La dinámica de crecimiento de las tres cepas se muestra en la gráfica 1, donde se observa: Un incremento de la población de la cepa 8-3 a través del tiempo confirmando así que ésta degrada el mancozeb para utilizarlo como fuente de nutrición teniendo en cuenta que no hubo suministro de medio de cultivo durante el periodo de incubación del Tubo 1. Sin embargo, se presenta un impacto del mancozeb sobre los microorganismos, evidenciándose en la disminución de la población inicial con respecto al control. En el caso de las cepas 6-3 y 2-2 se presentó un aumento de la población hasta las 24 horas lo que indica, que una vez consumido el 0.1% la glucosa y el 0.1% de nitrato de potasio, decrece el número de células por agotamiento de los nutrientes, significando que estas no utilizan el mancozeb. La cepa 6-3 mostró un leve aumento de la población entre las 48 y 72 horas debido posiblemente a que los productos de la lisis celular pueden estar siendo utilizados por las células existentes.

La cepa 8-3 fue clasificada como bacilos Gram negativos, oxidasa positivos, por el método de API 20NE con un periodo de incubación de 48 h *Pseudomonas putida* con porcentaje de identificación del 65,4% y con BBL CRISTAL *Stenotrophomona maltophilia* con un nivel de confianza de 38,4% (Laboratorio de microbiología ambiental y de suelos, Universidad Javeriana).

Gráfica 1. Dinámica de crecimiento de las cepas 2-2, 6-3 y 8-3 en cultivo estático de SGNM durante 72 h



3.2 Aislamiento de bacterias y prueba de antibi6sis para selecci6n de cepas sensibles a mancozeb

Las empresas que producen el fungicida Mancozeb por sus caracteristicas de insolubilidad (0.06µg/lit) en agua lo vuelven soluble para ser fumigado sobre el follaje, absorbi6ndolo en un compuesto del cual no se conoce su composici6n por reserva industrial, dicho compuesto es soluble en agua permitiendo una suspensi6n del fungicida, la part6cula de este compuesto tiene un tama1o parecido al de las bacterias pero es de forma irregular. Cuando se centrifugan los cultivos para retirar las bacterias es precipitado o si se filtran los medios de cultivo con membranas de nitrocelulosa de 0,4mm de di6metro es retenido, esta condici6n disminuye la cantidad de mancozeb presente en el sobrenadante hecho que vuelve compleja la determinaci6n de los residuos de mancozeb en los medios de cultivo cuando se usa el m6todo de HPLC (t6cnica recomendada que detecta partes por mill6n de mancozeb), si se quiere saber, si los microorganismos aislados son degradadores de dicho compuesto, se dificultar6 estandarizar el m6todo para HPLC con la presencia de microorganismos en las muestras a analizar. Este inconveniente nos llev6 a plantear un m6todo utilizando una bacteria sensible al mancozeb para detectar en forma indirecta los residuos de mancozeb en medios de cultivo con bacterias posibles degradadoras de mancozeb. El organismo sensible se aisl6 de muestras de suelo donde existe poca intervenci6n humana, para asegurar el aislamiento de microorganismos sensibles a un compuesto xenobi6tico como el mancozeb. De las muestras de suelo recolectadas en la vereda Cerezos Grandes del municipio de Chipaque, Cundinamarca, se aisl6 un bacilo Gram positivo esporulado que present6 alta sensibilidad a 0,0625 mg/ml de mancozeb, bacilo clasificado como *Bacillus cereus* en un 99.6 % por el m6todo Cristal Gram-Positive ID System / GP (Laboratorio de microbiolog6a ambiental y de suelos de la Universidad Javeriana)

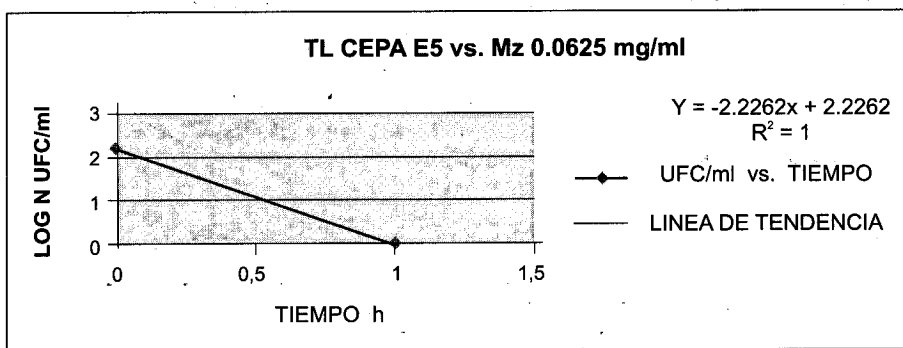
3.3 Ensayo 1. Tiempo de letalidad (TL) de mancozeb sobre la cepa e5

Con este ensayo se determin6 que el mancozeb a una concentraci6n de 0,0625mg/ml en contacto por espacio de una hora tiene una acci6n bactericida sobre la cepa E5 (Gr6fica 2), llegando a eliminar 100% de la poblaci6n por el resultado negativo de UFC en las cajas (tabla 1).

Tabla 1. Recuento UFC/ml de E5 a trav6s del tiempo TL con 0.0625 mg/ml de mancozeb

TIEMPO H	TUBO						PROMEDIO	LOG PROMEDIO	% DE LETALIDAD	CONTROL	LOG CONTROL
	1	2	3	4	5	6					
0	180	120	150	210	230	120	1,68E+02	2,23	99.9	9,60E+05	5.9
1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	9,80E+05	6.0

Grafica 2. TL del Mancozeb a 0.0625 mg/ml frente a la cepa E5



3.4 Comportamiento de la cepa E5 en medio mínimo esencial a diferentes concentraciones de mancozeb dl50, dl90 y dl100

Conociendo que el mancozeb tiene un alto nivel de letalidad frente a la cepa E5, se buscaron las dosis letales DL50, DL90 y DL100 para construir la curva patrón que nos permitió obtener las concentraciones residuales de mancozeb en cultivos con 8-3 y nos mostraron si había o no degradación del compuesto, mediante la interpolación del número de células viables de E5.

La tabla 2 muestra los resultados de recuento de colonias de cada una de las concentraciones de mancozeb preparadas. Se omitieron los resultados de las concentraciones 0.0625, 0.05, 0.0375, 0.0250, 0.0125, 0.01, 0.0095, 0.009 mg/ml porque en las siembras sin dilución el resultado fue negativo, indicando la eliminación total de las células a esas concentraciones.

Tabla 2. Recuento UFC/ml a diferentes concentraciones de mancozeb

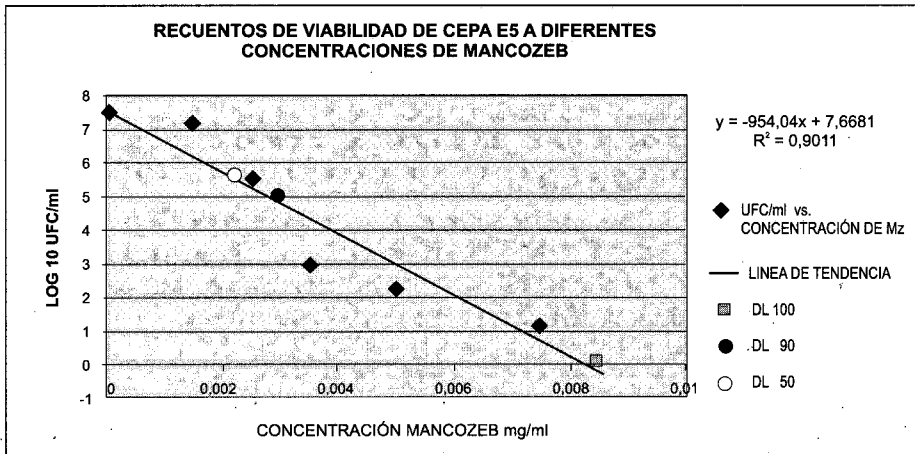
MANCOZEB mg/ml	TUBO			PROMEDIO			LOG PROM	
	1	2	3	1	2	3		
0,0085	0	0	0	0	0	0	0,00E+00	0
0,0075	21	12	18	16	7	21	1,58E+01	1,20
0,0050	193	209	218	187	182	212	2,00E+02	2,30
0,0035	1,00E+03	2,00E+03	1,00E+03	0	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	2,96
0,0020	9,70E+04	1,08E+05	9,30E+04	9,70E+04	9,30E+04	1,01E+05	9,79E+04	4,99
0,0025	3,06E+05	2,54E+05	2,78E+05	3,16E+05	3,04E+05	2,98E+05	2,93E+05	5,47
0,0022	4,80E+05	4,60E+05	5,80E+05	5,50E+05	3,90E+05	4,80E+05	4,90E+05	5,69
0,0015	1,90E+07	1,89E+07	1,29E+07	1,83E+07	1,06E+07	9,20E+06	1,48E+07	7,16
0	4,49E+07	3,12E+07	3,05E+07	4,28E+07	3,26E+07	3,08E+07	3,55E+07	7,55

DL100 DL90 DL50



Los resultados de los recuentos mostraron que la DL100 para la cepa E5 fue de 0,0085 mg/ml de mancozeb, la muerte del 90% de la población se logró con una dosis de 0,003 mg/ml de mancozeb y el 50% de la población se logró eliminar con una concentración de mancozeb de 0.0022 mg/ml. En la gráfica 3 se muestra la línea de tendencia que representa el impacto del mancozeb sobre la cepa E5, lo que nos permitió obtener la ecuación que se utilizó para determinar las dosis letales por interpolación y la degradación del mancozeb por la cepa 8-3:

Gráfica 3. Recuento de viabilidad de la cepa E5 a diferentes concentraciones de mancozeb



$Y = -954.04 X + 7.6681$, siendo Y el log UFC/ml, X la concentración de mancozeb mg/ml.

3.5 Determinación indirecta de la degradación de mancozeb por hidrólisis en caldo de cultivo SGP usando como indicador la cepa E5

Este ensayo se realizó para saber cual es la degradación natural por hidrólisis del mancozeb en medio de cultivo SGP y corroborar los reportes que afirman que el mancozeb se degrada en agua 1-5 días a 25°C en un rango de pH entre 5-9 en condiciones de oscuridad y esterilidad (R&H Company. 1987b; Calumpang, et al. 1993; EXTOKNET 1998).

Tabla 3. Recuento UFC/ml de E5 versus mancozeb a 0.0625 mg/ml a través del tiempo

TIEMPO H	TUBO						PROMEDIO UFC /ml	PROMEDIO LOG	PROM CONTROL
	1	2	3	4	5	6			
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1E+06
24	0	0	0	0	0	0	0	0	4,77E+07
48	0	0	0	0	0	0	0	0	2,61E+07
72	0	0	0	0	0	0	0	0	2,70E+07
96	4	2	1	2	3	2	3	0.48	2,53E+07
120	18	20	15	11	16	18	16	1.20	3,40E+07

En los resultados obtenidos, mostrados en la tabla 3, se observaron recuentos en las cajas 10^0 de la cepa E5 a partir de las 96 h de incubación de los caldos SGP con mancozeb, Tiempos dentro de los rangos reportados para la hidrólisis en medio acuoso de mancozeb (**CORPOICA, 2001, CALUMPANG, et al. 1993, y EXTOXNET, 1998**). El recuento promedio fue de 3 UFC/ml, $n = 6$. Utilizando la ecuación $Y = -954.04 X + 7.6681$ se obtuvo la concentración residual del Mancozeb por degradación natural en caldo SGP a las 96 y 120 h, correspondiente a 0,0076 y 0,0068 mg/ml respectivamente, sugiriendo que a las 120 h el mancozeb no se había degradado en su totalidad, que la acumulación de metabolitos desde las 0h de contacto del mancozeb con el medio de cultivo por degradación natural, no afectó el crecimiento de la cepa E5 y que la presencia de la molécula, compuesto polimérico de Manganeso etilen-1,2-bisditiocarbamato, en coordinación con iones de zinc, fue la causante de la letalidad de la cepa E5.

3.6 Determinación de la concentración de mancozeb por degradación biológica por la cepa 8-3 en MS suplementado con 0,2% nitrato de potasio como fuente de nitrógeno

Para determinar si la cepa 8-3 estaba involucrada con la biodegradación del mancozeb en medio de cultivo MS con fuente de nitrógeno, se usó la cepa E5 como indicadora de las concentraciones residuales. Un ensayo preliminar demostró que las cepas 8-3 y E5 no fueron antagonistas cuando se mezclaron en medio SGP, los resultados se presentan en las tablas 4 y en la tabla 5 los resultados del control de viabilidad de la cepa E5.

Tabla 4. Recuento viabilidad cepa E5 mezclada con cepa 8-3

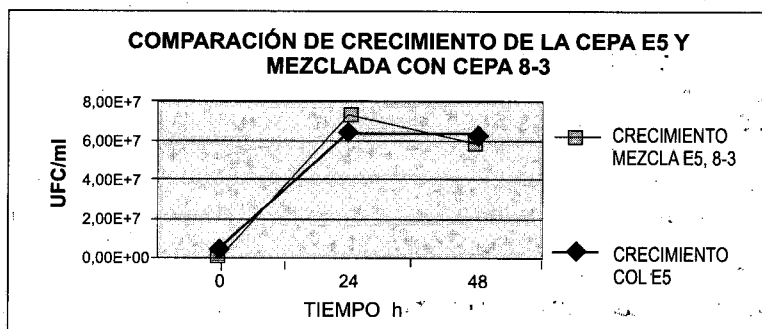
TIEMPO	CONTROL E5	ANTAGONISMO	PROMEDIO UFC/ml
0	3,40E+06	2,90E+06	3,15E+06
24	8,20E+07	6,30E+07	7,25E+07
48	6,00E+07	5,60E+07	5,80E+07

Tabla 5. Recuento viabilidad cepa E5

TIEMPO	CONTROL E5		PROMEDIO UFC/ml
0	3,70E+06	3,60E+06	3,65E+06
24	6,20E+07	6,70E+07	6,45E+07
48	5,50E+07	7,30E+07	6,40E+07

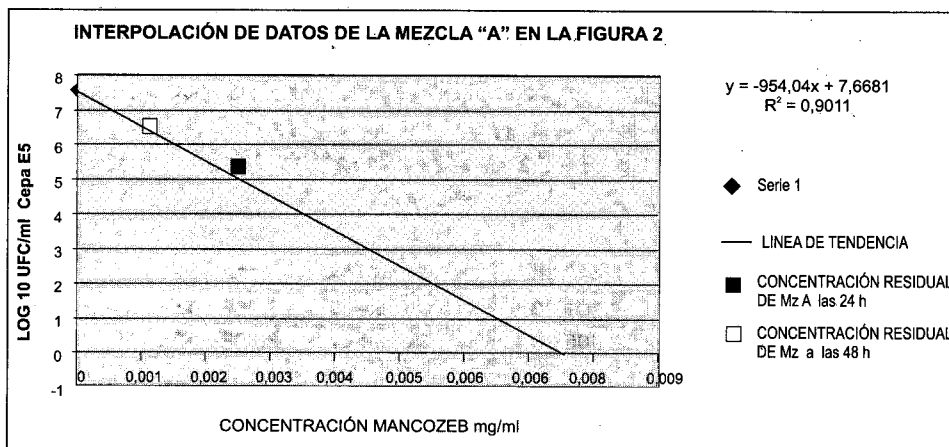
Los recuentos no presentaron mayor dificultad ya que las colonias de las dos cepas creciendo en la superficie del agar presentan morfologías macroscópicas diferenciables.

GRAFICA 4. Crecimiento de la cepa E5 mezclada con la cepa 8-3



La Gráfica 5, muestra la viabilidad y crecimiento de la cepa E5 cuando creció en presencia de la cepa 8-3 y comparada con el crecimiento cuando creció en cultivo puro. El resultado obtenido en este ensayo permitió usar la cepa como indicadora de la presencia de mancozeb en los caldos de cultivo.

Grafica 5. determinación de la concentración residual de mancozeb por degradación biológica con la cepa 8-3 mezclada con E5



La tabla 6 muestra los resultados del recuento de UFC/ml la cepa E5 mezclada con la cepa 8-3. Estos tubos contenían a las 0 h una concentración de mancozeb de 0,0625mg/2ml que era el Mancozeb total en el tubo, como esta concentración de mancozeb era superior a la DL100 reportada en este trabajo para la cepa E5, el resultado de conteos negativos es coherente. Los conteos a las 24h de incubación de la mezcla, presentaron un promedio de $1,97 \times 10^5$ UFC/ml de cepa E5, $n=36$, número de células cercano a la DL50 de reportada en este trabajo.

Tabla 6. Recuento de UFC/ml de la cepa E5 en mezcla con cepa 8-3

TIEMPO H	TUBO						PROMEDIO UFC/ml	PROMEDIO LOG UFC/ml	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE Mancozeb mg/ml
	1	2	3	4	5	6			
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,0625
24	2,80E+05	2,40E+05	1,60E+05	1,00E+05	1,90E+05	2,10E+05	1,97E+05	5,29	0,0025
48	4,60E+06	3,90E+06	4,40E+06	5,00E+06	3,60E+06	2,80E+06	4,05E+06	6,61	0,0011

Utilizando la formula $Y = -954.04 X + 7.6681$ se determinó que a las 0 h de incubación existe una concentración de mancozeb de 0,0625mg/ml y que a las 24 h es de 0,0025 mg/ml y a las 48 h ha disminuido a 0,0011 mg/ml significando que la cepa 8-3 en concentración de un millón de células por mililitro actúa sobre la molécula de mancozeb degradándola (tabla 6, Gráfica 5).

La técnica de cromatografía (HPLC) es la prueba reina para la detección de trazas de pesticidas en agua y suelos (**MOTTA, et al.** 1990; **EXTOXNET.** 1998), pero las condiciones en que se debe analizar la muestra en el caso de este trabajo dificultan su uso, porque la muestra a analizar (medio de cultivo con bacterias) se encuentra contaminada con muchos compuestos químicos que pueden alterar la prueba, como son los componentes del medio de cultivo donde se desarrolla el proceso de degradación con la bacteria, metabolitos y los componentes estructurales del microorganismo presente en el medio. Estos no se pueden eliminar por centrifugación ni filtración, debido a las características del Dithane M 45 NT, el cual tiene incorporado la molécula de mancozeb en un vehículo que le permite formar una suspensión en medio líquido (**GORDON et. al., 1967; EXTOXNET 1998**). El vehículo que es una partícula de tamaño similar al de las bacterias es retenido por filtros de nitrocelulosa de 0,45 mm y se precipita a la velocidad de centrifugación que se usa para eliminar las células de las bacterias de los sobrenadantes de los cultivos de digestión de mancozeb.

La metodología utilizada para determinar de forma indirecta la degradación biológica de mancozeb, por la cepa de *Pseudomonas putida* aislada de suelos de cultivos de papa, usó una cepa de *Bacillus cereus* sensible a mancozeb que no presenta diferencia considerable de mortalidad de células por competencia de nutrientes con la cepa 8-3, respecto al control de crecimiento de la cepa E5 en cultivo puro, es una alternativa al HPLC e importante como método de tamizaje en la búsqueda de organismos degradadores de pesticidas. Particularmente en el caso del *B. cereus* que presenta esporulación, se puede decir que los métodos utilizados se ajustaron para impedir que

el organismo esporulara durante los tiempos de incubación usando cultivos frescos de 24 h de incubación y con la revisión microscópica para la búsqueda de esporas.

La cepa aislada degradadora de mancozeb, *Pseudomonas putida* según los métodos de clasificación utilizados no permitieron la determinación con un porcentaje de seguridad adecuado, por lo tanto se debe realizar una identificación molecular para asegurar el género y especie correspondiente. Si embargo, la cepa muestra una gran posibilidad de ser usada en procesos de remediación de suelos contaminados con mancozeb, por los requerimientos nutricionales mínimos (sales) con la utilización del mancozeb como fuente de carbono y su hábitat original, el suelo propio de cultivos de papa, por su capacidad de crecer en concentraciones de 0,1 mg/ml de mancozeb y la potencia que presenta para degradar la molécula con una población de un millón de células viables, si se compara con la degradación por hidrólisis natural (Tabla 3), se destaca actividad biodegradadora de mancozeb por *Pseudomonas putida* (gráfica 6). Las cepas para su conservación se mantienen congeladas a -20 grados centígrados en un sistema CRYOBANK con pasajes cada 6 meses. Este sistema es seguro y muy práctico.

BIBLIOGRAFÍA

ALDRIDGE, W.N. AND L. MAGOS (1978) "Carbamates, thiocarbamates, dithiocarbamates", Luxembourg, Commission of the European Communities, Report No. V/F/1/78/75EN.

BOWDEN, W. B. 1977. Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Environmental Microbiology* 33:1229-1232.

CALUMPANG, S. M. F., M. J. B. MEDINA, N. P. ROXAS AND E. D. MAGALLONA. 1993. Movement and degradation of mancozeb fungicide and its metabolites, ethylenethiourea and ethyleneurea in silty clay loam soil, *Intern. J. of Pest Management*, 39(2), 161-166. CORPOICA, 2001. "Validación de componentes para la implementación de un programa de manejo integrado de plagas en el cultivo de la papa". Regional 1 Boyacá-Cundinamarca, Programa Nacional de Transferencia de Tecnología.

EWEIS Y COL, 1998. Tecnologías de remediación biológicas (biorremediación [en línea]: documenting electronic sources on the Internet. [fecha de consulta: 29 de febrero de 2004] Disponible en: http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/372/tecnolog.html?id_pub=372

EXTOXNET (1998) Mancozeb (<AHREF=>HTTP: pmpc.cce.cornell.edu profiles fung-nemat febuconazole-sulfur Mancozeb index.html?

FEDEPAPA, 1996 Federación Colombiana de Productores de papa, Vadenecum del cultivo de papa, primera edición

FRENO, L. H. Y TÉLLEZ, J., 1997. Motivaciones y uso de los plaguicidas en el cultivo de papa, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

GONZALEZ, MAURICIO. 2003. Biorremediación y tratamiento de afluentes. [En línea]-ilustrados_com.htm. Diciembre 3..

GORDON, C. F., SCHUCKERT, R. J. AND BORNAK, W. E..1967. Improved method for the determination of etilenebisdithiocarbamato residues in plants, fruit and vegetables. Journal. Assoc. Off. Anal. Chem. 50 : 1102-1108.

ICMSF. MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS 1. Técnicas de análisis microbiológico. Ed. Acribia vol. I I. S. B. N 84-200-0517-7 pg 113. 1982

Manual OXOID. 1995. p.249

MOTTA B., RODRÍGUEZ C., MONTENEGRO H., MARULANDA J., CORREA A., BENDECKE M. 1990. Métodos analíticos de laboratorio de suelos. Ministerio de Hacienda y Credito Público. Instituto Geográfico "Agustín Codazzi", Subdirección Agrícola. Bogotá, Colombia. R&H Company. (1987b), The hydrolytic decomposition of Dithane M-45 at room temperature, DPR Vol. 176-040 #53693, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA. World Health Organization (1988) Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and proplenethiourea: *a general introduction*, United Nations Environment program, the International Labor Organization, and the World Health Organization, Geneva.

XU Sue, 2000. Environmental fate of mancozeb. Environmental Monitoring & Pest Management Department of Pesticide Regulation Sacramento, CA 95814-3510.