

BIODEGRADACIÓN BACTERIANA DE PLAGUICIDAS PERMETRINA Y CIPERMETRINA EN CULTIVO LOTE

BACTERIAL BIODEGRADATION OF PERMETRINA AND CIPERMETRINA PESTICIDES IN CULTURE LOT

José C. Mendoza, Yazmin S. Perea, Jaime A. Salvador, Janette A. Morales y Gabriela Pérez
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química, 4 sur 104, colonia centro,
C.P. 72000 Puebla - México
(e-mail: jcharlymh@yahoo.com)

Recibido: 04/01/2011 - Evaluado: 07/02/2011 - Aceptado: 05/04/2011

RESUMEN

Fue estudiada la biodegradación de permetrina y cipermetrina a concentraciones de 50 y 100 mg/L, con cepas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*, en reactores por lotes. Las cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* fueron las que presentaron una mayor capacidad de biodegradación de los plaguicidas, a partir de los 5 días esta es del 65% para ambos plaguicidas y después de los 15 días se mantiene prácticamente constante, siendo de hasta el 95% para permetrina a 50 y 100 mg/L y para cipermetrina del 90% a 50 mg/L y 89% a 100 mg/L medido mediante espectrofotometría UV/Vis. La cinética de crecimiento y los espectros de infrarrojo muestran que hay una mayor capacidad de mineralización para el plaguicida permetrina que para la cipermetrina. Estos resultados indican que estas bacterias pueden ser usadas en procesos de biorremediación de estos plaguicidas.

ABSTRACT

The biodegradation of permethrin and cypermethrin (50 and 100 mg/L) with *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* and *Burkholderia cepacia* in batch reactors was studied. The strain of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina* showed a greater capability of biodegradation of pesticides, after 5 days, this is of 65% for both pesticides and after the 15 days it practically stays constant, being of until 95% for permethrin to 50 and 100 mg/l and for cypermethrin from 90% to 50 mg/l and 89% to 100 mg/l measured by means of spectrophotometry UV/Vis. Growth kinetic and infrared spectrum show that there is a major capacity of mineralization for permethrin that cypermethrin. These results indicate that these bacteria can be used in bioremediation processes of these pesticides.

Palabras clave: *Pseudomonas*; cinética de crecimiento; reactor por lotes; biodegradación
Keywords: *Pseudomonas*; growth kinetic; batch reactor; biodegradation

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas (herbicidas, fungicidas, insecticidas) son ampliamente utilizados en la agricultura y la industria en todo el mundo debido a su alta actividad. Más del 55% de la tierra usada para la producción agrícola en países en vías de desarrollo usa cerca del 26% del total de plaguicidas producidos en el mundo. Sin embargo, el coeficiente de incremento en el uso de estos dentro de países en vías de desarrollo es considerablemente más alto que el de los países desarrollados. Los plaguicidas son necesarios para proteger las cosechas ya que las pérdidas que pueden ascender cerca del 45% de la producción alimentaria total mundial. Aunque hay varias clases de plaguicidas, los piretroides son de los más importantes porque incluso en muy baja concentración son más eficaces. Estos suelen ser usados contra moscas, mosquitos, y áfidos.

Los piretroides tienen cuatro generaciones importantes entre estos la permetrina que pertenece a la tercera generación y la cipermetrina a la cuarta. La permetrina es usada para el control de una gran variedad de insectos en agricultura, veterinaria y usos domésticos, y la cipermetrina es más eficaz contra parásitos incluyendo los de la polilla del algodón, de las frutas y la verdura. El uso extenso e incorrecto de productos químicos lleva a mayor riesgo para la salud de las plantas, animales y a la población humana. Uno de los graves problemas de plaguicidas es su gran persistencia lo cual aumenta su toxicidad y la carcinogenicidad (Dalvie et al., 2003; Holmes et al., 2008; Murugesan et al., 2010).

La presencia de residuos y de metabolitos de plaguicidas en el alimento, agua y suelo representa actualmente uno de los temas importantes para la química ambiental (Mostafa, 2010). Existe una gran variedad de métodos físicos y químicos para tratar los suelos y mantos acuíferos contaminados, pero muchos de estos tratamientos no destruyen los compuestos peligrosos sino que los transfieren de una fase a otra, por lo que el tratamiento biológico en el que se transforman estos compuestos peligrosos en compuestos más simples sigue siendo un desafío importante en la actualidad. Estos ofrecen las ventajas del funcionamiento a temperatura y presión ambiental, reduciendo gastos del capital y de operación. Sin embargo, una limitación de los sistemas de biotratamiento, es el potencial tóxico de agentes xenobióticos. En la práctica, esto significa que se debe tener un gran cuidado con los microorganismos usados ya que pueden ser inhibidos o causar su muerte por los efectos tóxicos de los contaminantes orgánicos (Beshay et al., 2002). Para la biodegradación, el plaguicida podrá servir idealmente como la única fuente de carbón y energía para los microorganismos, incluyendo la síntesis de las enzimas apropiadas para la transformación de este, proporcionando un mecanismo importante en la degradación de compuestos xenobióticos en el ambiente (Murugesan et al., 2010).

El objetivo de este trabajo fue analizar y cuantificar la biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina mediante *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*, utilizando espectrofotometría UV-visible e infrarrojo.

METODOLOGÍA

Microorganismo. Las bacterias fueron aisladas de suelos contaminados por hidrocarburos del municipio de Acatzingo, Puebla. Éstas fueron identificadas mediante el sistema APINE-20, y mantenidas a -20°C hasta su uso.

Preparación del inoculo. Las cepas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia* se propagaron en medio mínimo mineral (3 g K₂HPO₄, 0.5 g KH₂PO₄, 1.25 g (NH₄)₂SO₄, 10 mg NaCl, 100 mg MgSO₄, 1 mg FeSO₄ · 7H₂O, 200 mg EDTA por litro) a 25° C durante 72 horas, después de este tiempo se realizó un ajuste espectrofotométrico a 0.2 A en una longitud de onda de 600 nm, para obtener aproximadamente 1x10⁶ bacterias/ml.

Cultivo Batch: Los reactores biológicos se prepararon en matraces redondos de 1000 mL con 500 mL de medio mínimo mineral y el plaguicida (permetrina o cipermetrina) en concentraciones de 50 ó 100 mg/L, con una concentración bacteriana de 1×10^5 bacterias/mL. Para cada bacteria se usó un reactor y el del consorcio bacteriano fue una mezcla de cada una de las cepas en proporciones iguales, cada experimento se realizó por triplicado. Posteriormente se incubaron a 25°C, con agitación de 90 rpm.

Muestreo y determinación UV/vis de la biodegradación: Se tomaron muestras de 5 mL cada 5 días durante 20 días. A éstas se les realizó una centrifugación a 15.000 rpm durante 30 minutos, para separar el paquete celular del sobrenadante. Al sobrenadante se le realizó análisis de espectrofotometría Uv/Vis para determinar el porcentaje de biodegradación obtenido de cada cepa con los diferentes plaguicidas. Las lecturas espectrofotométricas de los plaguicidas permetrina y cipermetrina se hicieron a una longitud de onda de 220.5 y 219.1 nm respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Cuantificación del crecimiento bacteriano: El paquete celular obtenido se re-suspendió en 10 mL de medio mínimo mineral y se le determinó la absorbancia a 600nm.

Infrarrojo: Al sobrenadante se le realizó un barrido (4000 a 600 cm^{-1}) mediante el sistema ATR del espectrofotómetro de Infrarrojo de transformada de Fourier, modelo spectrum one de Perkin Elmer, para la observación de la biodegradación de los plaguicidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de crecimiento bacteriano

En el presente estudio en donde se probaron cinco cepas diferentes y el consorcio bacteriano formado por la combinación proporcional de todas, se puede observar el comportamiento del crecimiento de las mismas en el proceso de biodegradación o biotransformación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina a las concentraciones de 50 y 100 mg/L. La cinética de biodegradación proporciona una evidencia del potencial de mineralización de las bacterias, siendo mayor el crecimiento en concentraciones más bajas, esto concuerda con los estudios Grant et al. (2002); Jilani y Altaf (2006); Malik et al. (2009) y Murugesan et al. (2010).

En las Figuras 1 y 2, se observa el comportamiento del crecimiento bacteriano durante el proceso de biodegradación del plaguicida permetrina a 50 y 100 mg/L respectivamente, en donde las bacterias presentaron diferencias en ambas concentraciones, siendo *Chromobacterium violaceum* una de las cepas que presentó un mayor crecimiento, aunque no haya sido de las bacterias que mejor realizó una biodegradación; en el caso de *Burkholderia cepacia*, fue la que tuvo mayor crecimiento a 100 mg/L y el menor a 50 mg/L, lo que establece que esta cepa presenta una buena adaptación a concentraciones elevadas de plaguicida; *Pseudomonas mendocina 02* fue la segunda bacteria que mejor creció a 50 mg/L, sin embargo a 100 mg/L su proceso de adaptación fue un poco menor; para las demás cepas bacterianas los procesos de crecimiento a 50 y 100 mg/L fueron similares.

En las Figuras 3 y 4, se puede observar el comportamiento del crecimiento de las bacterias durante el proceso de biodegradación del plaguicida cipermetrina, en donde la bacteria de *Pseudomonas mendocina 01* presentó el mayor crecimiento a 50 mg/L, seguido de *Pseudomonas putida*, consorcio bacteriano, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas mendocina 02*, y *Burkholderia cepacia*; mientras que para la concentración de 100 mg/L *Chromobacterium violaceum* presentó la mejor adaptación, el segundo género bacteriano mejor adaptado correspondió a *Pseudomonas mendocina 02*, , seguido de *Pseudomonas mendocina 01*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*, y el que menos adaptación tuvo fue el consorcio bacteriano.

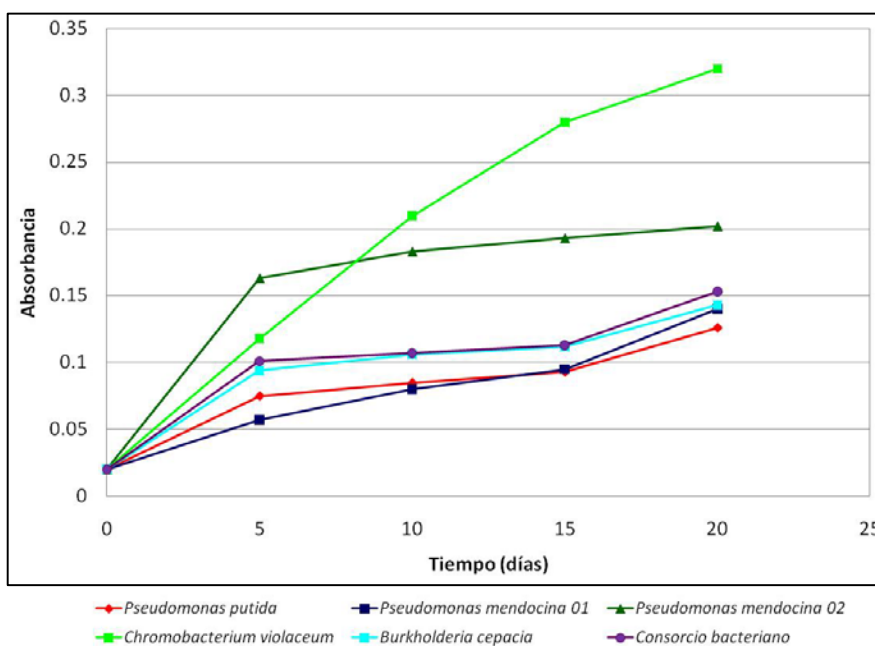


Fig. 1: Grafico comparativo del crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida permetrina a 50 ppm

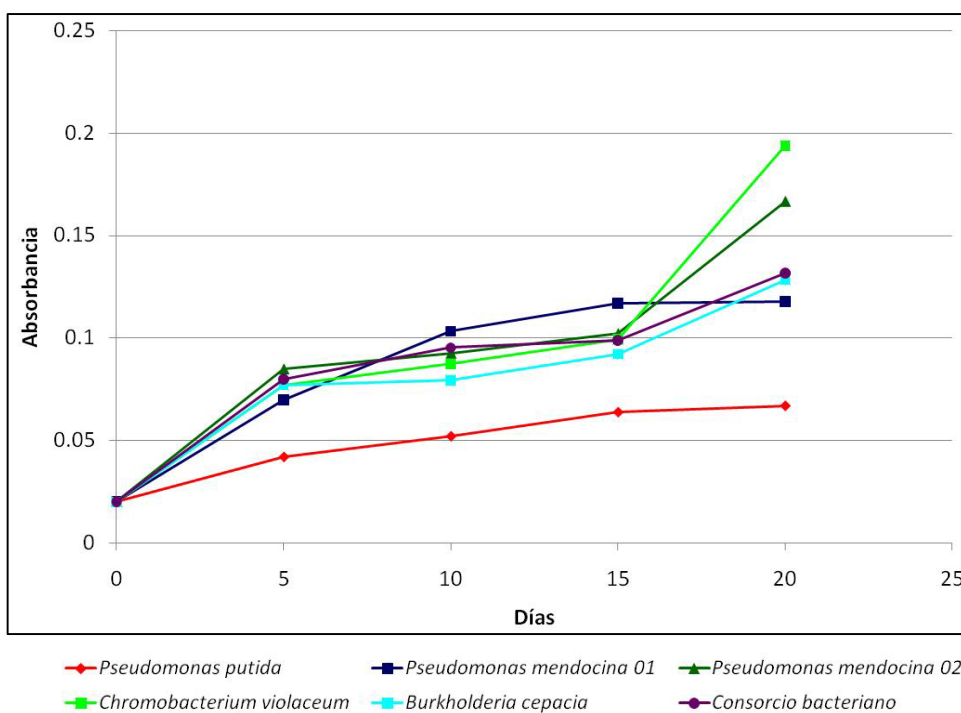


Fig. 2: Grafico comparativo del crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida permetrina a 100 ppm.

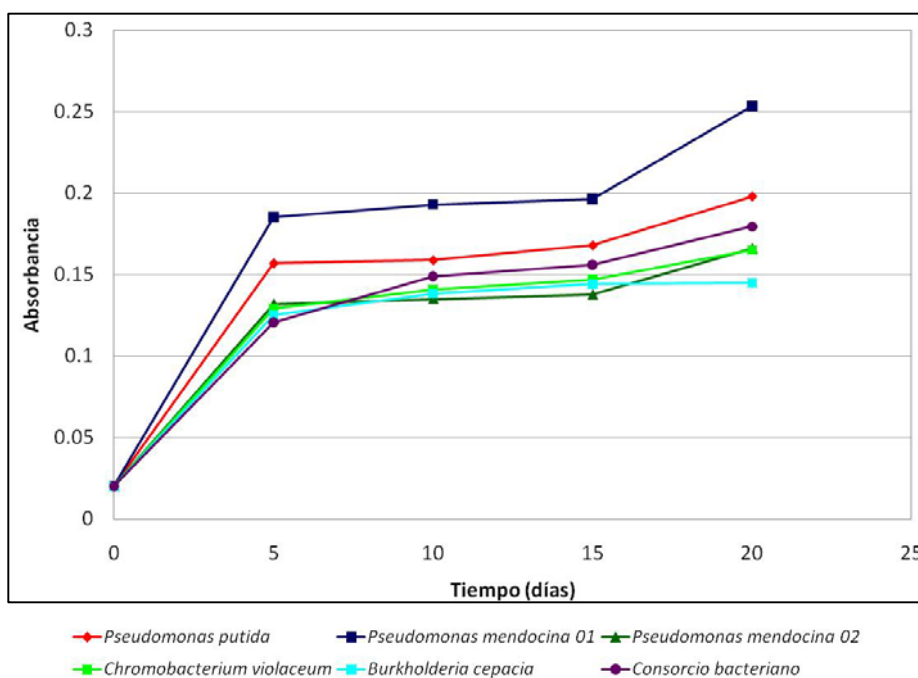


Fig. 3: Grafico comparativo del crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida cipermetrina a 50 ppm.

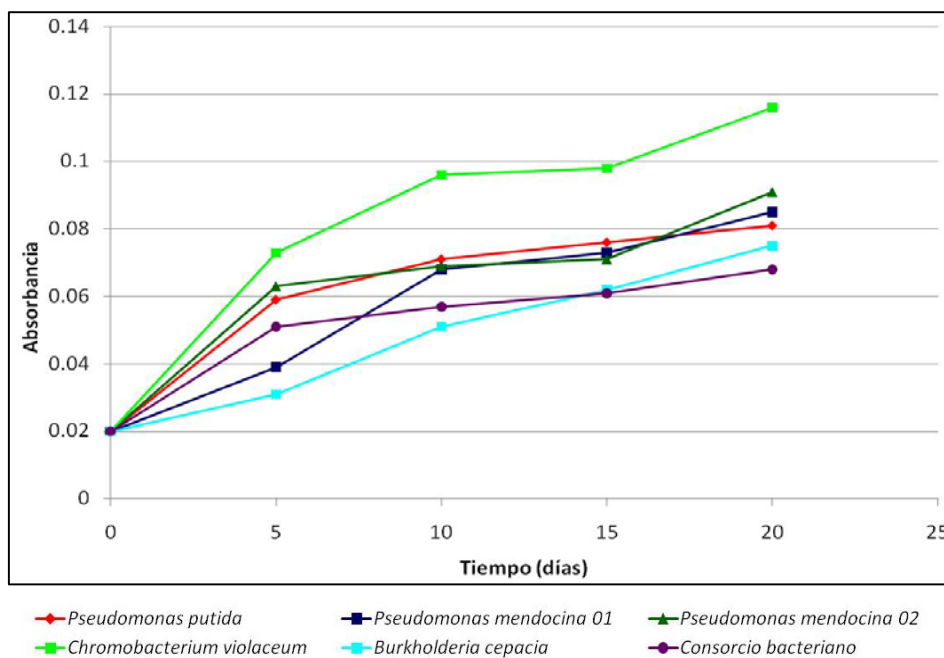


Fig. 4: Grafico comparativo del crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida cipermetrina a 100 ppm.

Cinética de biodegradación

Las cepas bacterianas probadas en la biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina muestran diferente habilidad para realizarla, dependiendo de la concentración de los mismos. Se puede observar, en la Figura 5, que el porcentaje de biodegradación del plaguicida permetrina en una concentración de 50 mg/L a los 5 días va desde un mínimo del 90% realizado por *Burkholderia cepacia*, hasta un 94% de *Pseudomonas putida*, de ahí en adelante se mantiene prácticamente constante y la biodegradación a los 20 días es del 96% para *Pseudomonas mendocina 01*, 95.6% *Burkholderia cepacia*, 95.1% *Pseudomonas putida*, 95.1% *Pseudomonas mendocina 02*, 94% *Chromobacterium violaceum*, y 92.6% consorcio de todas las bacterias.

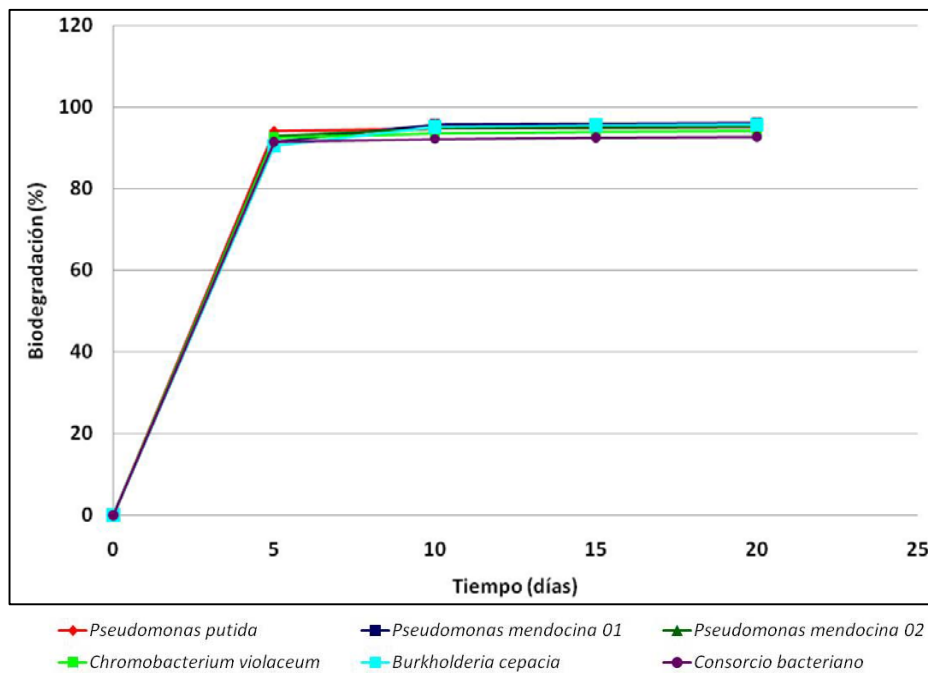


Fig. 5: Grafico comparativo del porcentaje de biodegradación del plaguicida permetrina a 50 ppm mediante espectrofotometría UV/vis

Los resultados de la biodegradación del plaguicida permetrina a 100 mg/L muestran (Figura 6) que el proceso fue más lento que a 50 mg/L (Figura 7), debido a que a los 5 días el porcentaje fue de entre un 69-71% siendo muy similar para todas las cepas, esto podría deberse a la adaptación que presentan las bacterias al exponerse a una mayor concentración de plaguicida, en los siguientes 10 días la biodegradación continuo aumentando, para posteriormente mantenerse casi constante entre los 15 y 20 días en donde *Pseudomonas putida* degrado aproximadamente el 97%, seguida de *Pseudomonas mendocina 02* con un 95%, y para el resto de las bacterias ensayadas incluyendo el consorcio fue del 91%.

Para la biodegradación de la cipermetrina a 100 mg/L (Figura 8), se puede apreciar que las cepas de *Pseudomonas mendocina 01* y *02* tuvieron un comportamiento similar degradando al plaguicida en un 74% a los 5 días, *Pseudomonas putida* degradó el 75%; *Burkholderia cepacia*, y *Chromobacterium violaceum* el 78% y finalmente el consorcio bacteriano fue el que presento el mayor porcentaje con un 79%; posteriormente entre los 10 y 15 días siguieron aumentando, y de ahí se mantuvieron prácticamente constante hasta el día 20, teniendo todas las cepas un comportamiento similar donde *Pseudomonas mendocina 01* y *02* degradaron el 85 y

86% respectivamente, *Pseudomonas putida* el 87%, *Burkholderia cepacia* 88%, *Chromobacterium violaceum* el 89% y finalmente el consorcio bacteriano un 90%.

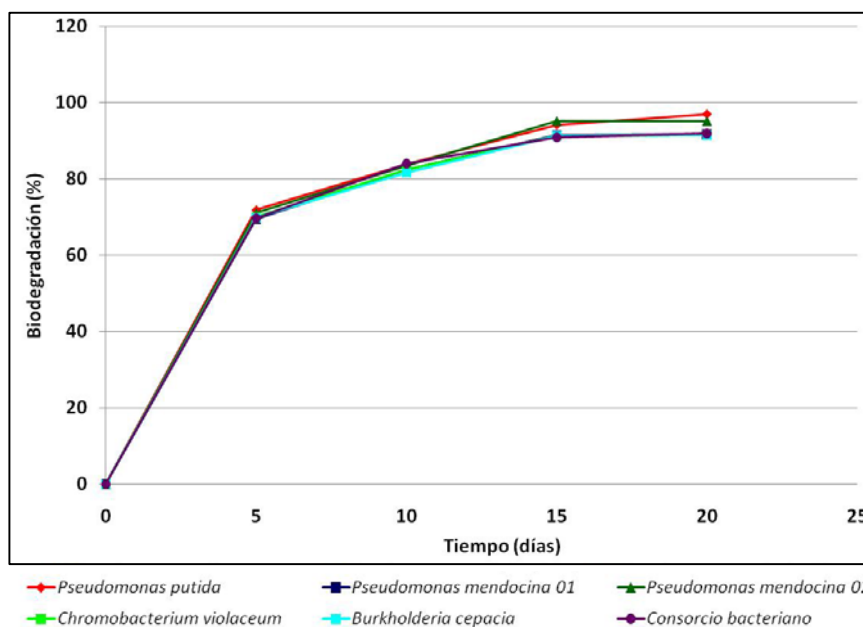


Fig. 6: Grafico comparativo del porcentaje de biodegradación del plaguicida permetrina a 100 ppm mediante espectrofotometría UV/vis

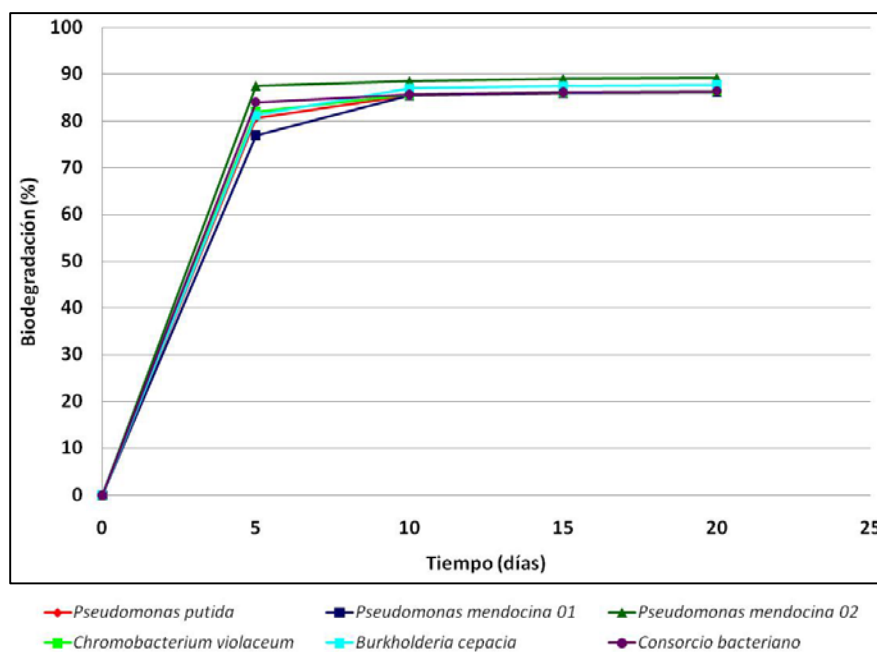


Fig. 7: Grafico comparativo del porcentaje de biodegradación del plaguicida cipermetrina a 50 ppm mediante espectrofotometría UV/vis

El análisis de la biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina a las concentraciones de 50 y 100 mg/L indica que de las diferentes cepas probadas *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas putida* fueron de las que presentaron una mayor capacidad de biodegradación para ambos plaguicidas, las cuales se ha demostrado que tienen una amplia capacidad para la biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina, como lo han reportado por Bhadbhabe et al. (2002); Lee et al. (2004); Jilani y Altaf (2006); Malik et al. (2009); Boricha y Fulekar (2009); Maloney et al., 1998 y Murugesan et al. (2010). Para la permetrina y cipermetrina a una concentración de 50 mg/L las bacterias entran a una fase estacionaria de biodegradación a partir de los 10 días de estar en contacto con los plaguicidas logrando degradar más del 95% para la permetrina y hasta un 90% para la cipermetrina; por otra parte para las concentraciones de 100 mg/L el proceso es un poco diferente ya que a partir del día 15 es cuando la biodegradación se mantiene prácticamente constante, logrando degradar hasta el 97% para permetrina y el 89% para cipermetrina.

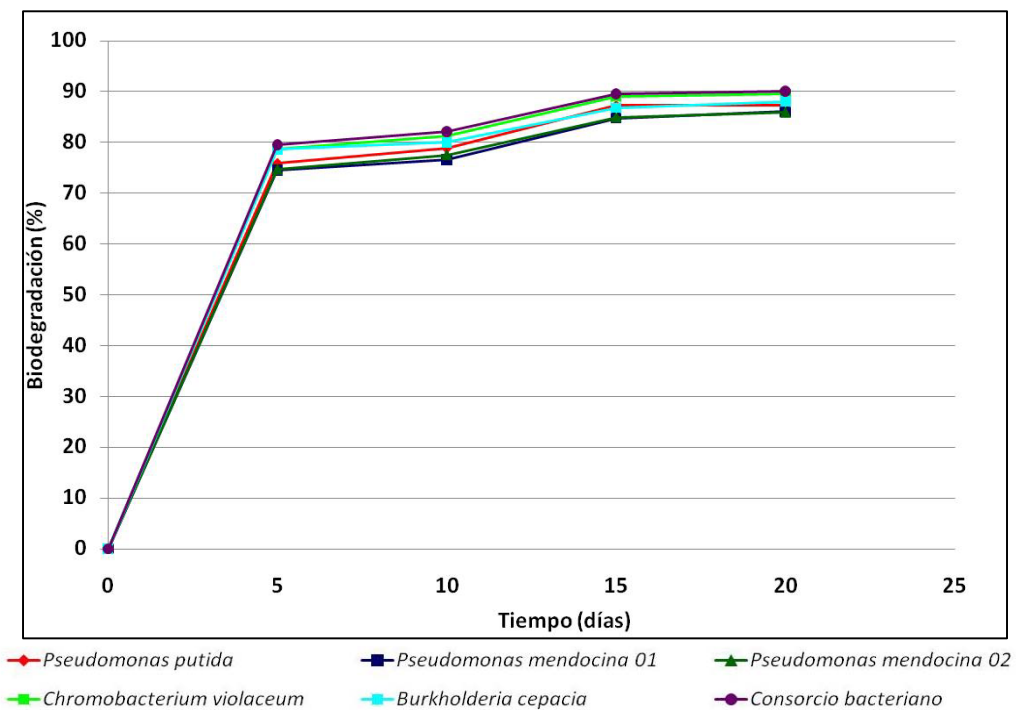


Fig. 8: Grafico comparativo del porcentaje de biodegradación del plaguicida cipermetrina a 100 ppm mediante espectrofotometria UV/Vis

El análisis de los espectros de infrarrojo de la biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina, entregan una confirmación de la capacidad de mineralización de las bacterias, debido a que se disminuye considerablemente la presencia de los diferentes grupos aromáticos transformándolos en grupos alifáticos más sencillos. En la figura 9, es notable la capacidad de biodegradación del plaguicida permetrina a los 20 días por las bacterias estudiadas, las bacterias *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* son las que mejor actuaron, ya que los picos de absorbancia de todos los grupos funcionales prácticamente desaparecieron, los que menos se degradaron fueron los grupos álcalis que absorben en la región de 2855-2990, y los aril-éter en la región de 1075-1140, y aparecen unos picos en la región de 2330, indicando una fuerza de tensión correspondiente al C=O, todo esto nos establece que hay un buen proceso de mineralización del plaguicida permetrina.

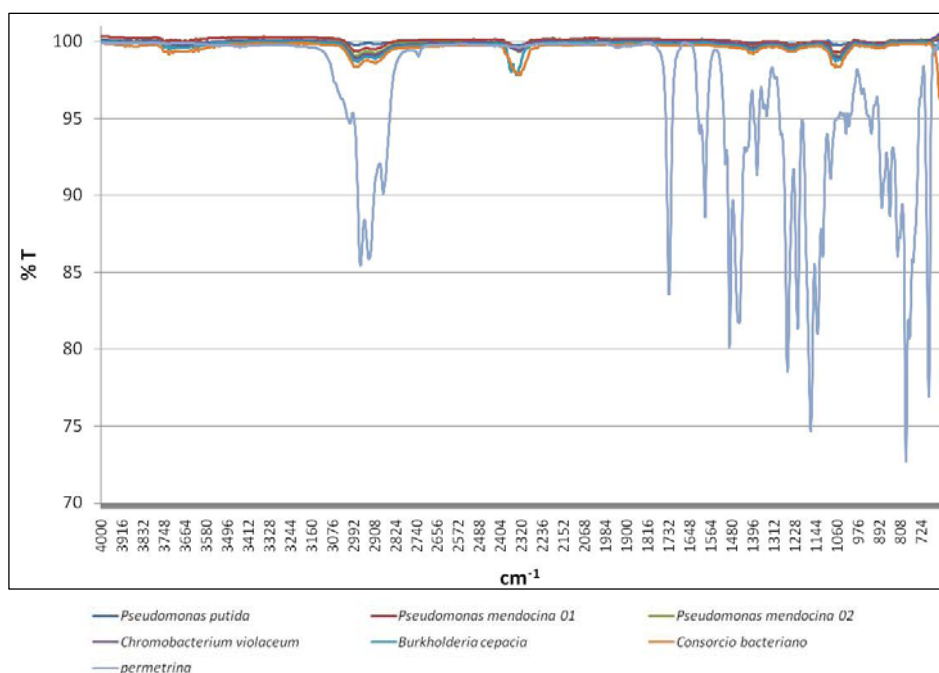


Fig. 9: Grafico comparativo de los espectros de biodegradación del plaguicida permetrina a 100 ppm mediante espectrofotometría IR

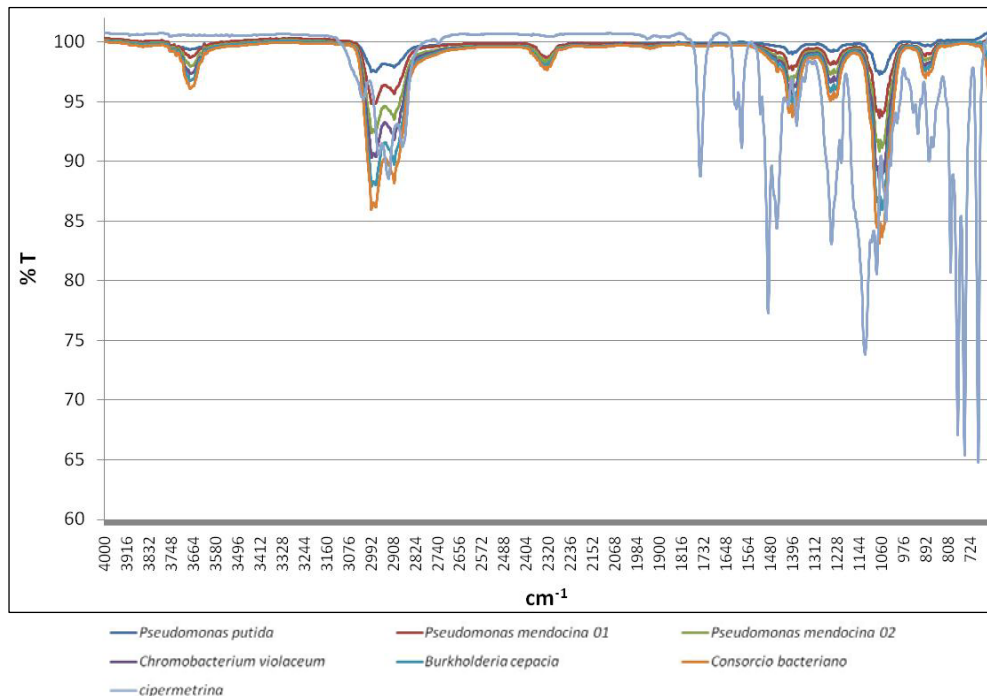


Fig. 10: Grafico comparativo de los espectros de biodegradación del plaguicida cipermetrina a 100 ppm mediante espectrofotometría IR.

En la figura 10 se observa que después de los 20 días en el que las bacterias estuvieron en contacto con la permetrina, el mejor resultado de biodegradación correspondió a *Pseudomonas putida*, debido a que disminuye los picos de la región de 1060-1150 que corresponden a los ésteres alifáticos, 690-880 grupos aromáticos fenoxi o monosustituidos, 2855-2990 los grupos álcalis y aparecen unos picos en la región de 2330 y 3600, indicando una fuerza de tensión correspondiente al C=O y grupos OH , respectivamente. Para las demás bacterias la reducción de los picos de ésteres alifáticos, grupos aromáticos fenoxi o monosustituidos es similar, sin embargo en la región de 2855-2990 los grupos álcalis aumentan, indicando que posiblemente los grupos aromáticos se están transformando en grupos alifáticos más sencillos y menos tóxicos, llevándose a cabo el proceso de mineralización.

CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que estas bacterias pueden ser usadas para la biodegradación de los plaguicidas del tipo piretroide, mineralizándolos hasta en un 90% en un periodo de entre 5 a 20 días, ya sea de manera individual o como consorcios bacterianos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de este proyecto a PROMEP.

REFERENCIAS

- Beshay, U.; Desouky, Abd-El-Haleem; Hassan, Moawad; Sahar, Z. (2002); *Phenol biodegradation by free and immobilized Acinetobacter*. Biotechnology Letters: 24, 1295–1297.
- Bhadbhabe, B.J.; Dhakephalkar, P.K.; Sarnaik, S.S.; Kanekar, P.P. (2002); *Plasmid-associated biodegradation of organophosphorus pesticide, Monocrotophos, by Pseudomonas mendocina*. Biotechnology Letters: 24, 647-650.
- Boricha, H.; Fulekar, M.H. (2009); *Pseudomonas plecoglossicida as a novel organism for the bioremediation of cypermethrin*. Biology and Medicine: 1(4), 1-10.
- Dalvie, M.; Cairncross, E.; Solomon, A.; London, L. (2003); *Contamination of rural surface and ground water by endosulfan in farming areas of the Western Cape, South Africa*. Environ. Health.: 2, 1-15.
- Grant, R.J.; Daniell, T.J.; Betts, W.B. (2002); *Isolation and identification of synthetic pyrethroid degrading bacteria*. J. Appl. Microbiol.: 2, 534-540.
- Holmes, R.W.; Anderson, B.; Phillips, B.; Hunt, J.W.; Crane, D.; Mekebri, A.; Connor, V. (2008); *Statewide Investigation of the Role of Pyrethroid Pesticides in Sediment Toxicity in California's Urban Waterways*. Environ. Sci. Technol.: 42, 7003–7009.
- Jilani, S.; Altaf Khan, M. (2006); *Biodegradation of Cypermethrin by pseudomonas in a batch activated sludge process*. Int. J. Environ. Sci. Tech.: 3(4), 371-380.
- Lee, S.J.; Gan, J.; Kabashima, J.N.; Crowley, D. (2004); *Microbial transformation of pyrethroids insecticides in aqueous and sediment phases*. Environ. Toxicol. Chem.: 23, 1-6.
- Malik, D.; Singh, M.; Bhatia, P. (2009); *Biodegradation of Cypermethrin by a Pseudomonas Strain Cyp19 and its use in Bioremediation of contaminated soil*. Journal of Microbiology. 6(2). http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume_6_number_2_34/article_printable/biodegradation-of-cypermethrin-by-a-pseudomonas-strain-cyp19-and-its-use-in-bioremediation-of-contaminated-soil.html

Maloney, S.E.; Maule, A.; Smith, A.R. (1998); *Microbial transformation of pyrethroids insecticides; Permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate, and fluvalinate*. Appl. Environ. Microbiol.: 54, 2874-2876.

Mostafa Gamal, A.E. (2010); *Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides*. The Open Electrochemistry Journal: 2, 22-42.

Murugesan, A.G.; Jeyasanthi, T.; Maheswari, S. (2010); *Isolation and characterization of cypermethrin utilizing bacteria from Brinjal cultivated soil*. African Journal of Microbiology Research: 4(1), 10-13.

