



Organophosphorus pesticides degrading bacteria present in contaminated soils

Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados presentes en suelos contaminados

Dra. Beatriz E. Jaramillo Colorado, Dra. Adriana Bermúdez Tobón, M.Sc. Irina Tirado Ballestas

Universidad de Cartagena, Campus San Pablo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Cartagena, Colombia.

ABSTRACT. The characterization of organophosphorus degrading bacteria present at three subsamples in soils from a contaminated land by pesticides, at southeast of Cartagena de Indias-Bolívar, Colombia was performed. These samples were homogenized and treated as a single sample, one part was separated for pesticide extraction and the second one was subject to monocrotophos (200 ppm) for 30 days. Bacteria capable to develop in a highly selective media with organophosphorus were isolated and biochemically identified by using BBL Crystal[®] kit. Bacterial growing was confirmed by means of UV-VIS spectroscopy of M9 liquid medium, and verification of pesticide bacterial degradation was performed by gas chromatography coupled flame ionization detector. According to the study at the molecular level of ribosomal gene 16S, it was determined that the three bacterial strains isolated from soil (C1, C2 and C3) belong to Enterobacteriaceae family. These species showed their ability to degrade organophosphorus pesticides.

Keywords: soil, organophosphorus, biodegradation, metabolism, bacteria.

RESUMEN. Se realizó la caracterización de bacterias degradadoras de compuestos organofosforados de tres submuestras de un terreno contaminado por pesticidas, ubicado en la zona suroriental de la ciudad de Cartagena de Indias-Bolívar, Colombia. Estas muestras se homogenizaron y trataron como una sola muestra, una parte se empleó para la extracción de pesticidas y la segunda fracción del suelo se expuso a una concentración conocida de un pesticida organofosforado, monocrotopós (200 ppm) por 30 días. Se aislaron, de la muestra de suelo, las bacterias con capacidad para desarrollarse en medio altamente selectivo para pesticidas organofosforados y se identificaron bioquímicamente usando el kit BBL Crystal[®]. El crecimiento bacteriano fue confirmado por medio de espectroscopia UV-VIS del medio líquido M9, y la verificación de la degradación del pesticida fue realizada por medio de Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización en llama. De acuerdo con el estudio a nivel molecular del gen ribosomal 16S, se pudo determinar que las tres cepas bacterianas aisladas de los suelos (C1, C2 y C3) pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Estas especies demostraron su capacidad para la degradación de pesticidas organofosforados.

Palabras clave: suelo, organofosforado, biodegradación, metabolismo, bacterias.

INTRODUCTION

Organophosphorus chemicals (OF) were developed during the decade of the fifties and used as “nerve gases” during World War II (de Silva *et al.*, 2006). Currently, they are recognized primarily their usage in agriculture as fertilizers and insecticides, existing in the market about fifty thousand kinds of these compounds (Eddleston *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Because of the indiscriminate and irresponsible usage OF in agro-industry, there is a high rate of acute poisoning characterized by the development of cholinergic syndrome and multiple chronic complications, killing at least 400,000

INTRODUCCIÓN

Los compuestos químicos organofosforados (OF), fueron desarrollados durante la década de los años cincuenta y usados como “gases nerviosos”, durante la Segunda Guerra Mundial (de Silva *et al.*, 2006). Actualmente, se les reconoce principalmente por su utilización en la agricultura como fertilizantes e insecticidas, existiendo en el mercado aproximadamente cincuenta mil tipos de estos compuestos (Eddleston *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Debido al uso indiscriminado e irresponsable de los OF en agroindustria, existe un alto índice de intoxicaciones agudas caracterizadas por el desarrollo del

people annually worldwide (Eddleston & Phillips, 2004; Eddleston *et al.*, 2012).

Colombia ranks third in Latin America in the usage of pesticides after Brazil and Mexico. According to the Food and Agricultural Organization (FAO), the Colombian agro-industry constitutes 40% of the workforce and accounts for 50% of national currencies (Bruinsma & FAO, 2003). So, for example, in 2002, the usage of standard agrochemicals like pesticides or fertilizers exceeded 28 million kilograms of which 97% were insecticides (mainly organophosphates and carbamates) followed by herbicides and fungicides (Alegrett, 2002; Mojica & Guerrero, 2010). One of the problems associated with the use of OF is that given their effectiveness, abused products and do not have a proper management of those chemicals or their residues, causing a public health problem (MAVDT, 2006; Murcia & Stashenko, 2008). In 2008 and 2009 the Regional Autonomous Corporation of Southern Bolívar (CSB) conducted a monitoring of the coastal zone of the Caribbean region, finding pesticide compounds in coastal waters and sediments above the detection limit¹ (CBS, 2009). A serious case because of the magnitude of the environmental damage was documented by the Group of Epidemiology and Population Health at the University of Valle, Colombia, in which, in a town of Cartagena de Indias (Ciudadela 2000), pesticides were found buried on the right bank of Troncal de Occidente, affecting four districts and a high school² (MAVDT, 2006).

Given the impact of contamination OF in our country, the usage of techniques that mitigate the impact of these pollutants in soils and water sources is required (Das & Adhya, 2015) O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinol. One of the techniques used to reduce environmental OF, is bacterial bioremediation (Abraham *et al.*, 2014). This uses microorganisms capable of degrading complex chemical compounds through various metabolic pathways under aerobic or anaerobic conditions (Cycoń *et al.*, 2009; Marín & Jaramillo, 2015). Which leads to obtain high rates of efficiency and effectiveness at low cost in reducing the level of contamination OF.

In Cartagena of Indias, a qualitative confirmation of OF compounds presence was conducted in contaminated soils in neighborhood Ciudadela 2000 neighborhood and native bacterial strains were isolated. Subsequently, those microorganisms selected in M9 (highly selective medium) with OF as sole carbon source, were characterized biochemical and molecularly.

METHODS

Soil samples were collected in plot of Santa Elena land, located in the road out of the municipality of Cartagena to Turbaco, on the right bank of Troncal de Occidente, Cartagena,

síndrome colinérgico y múltiples complicaciones crónicas, mandando al menos a 400.000 personas anualmente a nivel mundial (Eddleston y Phillips, 2004; Eddleston *et al.*, 2012).

Colombia ocupa el tercer puesto en América Latina en el uso de plaguicidas después de Brasil y México. De acuerdo con la *Food and Agricultural Organization* (FAO), la agroindustria colombiana constituye el 40% de la fuerza laboral y representa el 50% de las divisas nacionales (Bruinsma y FAO, 2003). Por lo que, por ejemplo, durante el año 2002, el empleo de agroquímicos de tipo plaguicida o fertilizante superó los 28 millones de kilogramos de los cuales el 97% correspondieron a insecticidas (principalmente organofosforados y carbamatos) seguidos por herbicidas y fungicidas (Alegrett, 2002; Mojica y Guerrero, 2010). Uno de los problemas asociados al uso de OF es que dada su efectividad, se abusa de los productos y no se tiene un manejo adecuado de las sustancias o sus residuos, ocasionando un problema de salud pública (MAVDT, 2006; Murcia y Stashenko, 2008). En los años 2008 y 2009 la Corporación Autónoma Regional del Sur de Bolívar (CSB) realizó un monitoreo de la zona costera de la región Caribe, encontrando compuestos plaguicidas en las aguas costeras y sedimentos, por encima del límite de detección¹. Un caso grave, debido a la magnitud del daño ambiental, fue documentado por el Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional de la Universidad del Valle, en el cual, en una localidad de Cartagena de Indias (Ciudadela 2000), fueron hallados plaguicidas enterrados sobre la margen derecha de la Troncal de Occidente, afectando 4 barrios y un colegio² (MAVDT, 2006).

Dado el impacto de la contaminación por OF en nuestro país, se requiere el uso de técnicas que mitiguen el impacto de este tipo de contaminantes en suelos y fuentes hídricas (Das y Adhya, 2015) O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinol. Una de las técnicas empleadas para reducir los OF en el medio ambiente, es la biorremediación bacteriana (Abraham *et al.*, 2014). Ésta, utiliza microorganismos capaces de degradar compuestos químicos complejos por medio de diversas rutas metabólicas bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Cycoń *et al.*, 2009; Marín y Jaramillo, 2015). Lo que conlleva a obtener altas tasas de eficiencia y eficacia a bajos costos en la reducción del nivel de contaminación por OF.

En Cartagena de Indias, se realizó la confirmación cualitativa de la presencia de compuestos OF en los suelos contaminados de la localidad Ciudadela 2000 y se aislaron cepas bacterianas autóctonas. Posteriormente se caracterizaron bioquímica y molecularmente aquellos microorganismos seleccionados en M9 (medio altamente selectivo) con OF como única fuente de carbono.

MÉTODOS

Las muestras de suelos fueron colectadas en el Lote Santa Elena, localizado en la salida del municipio de Cartagena hacia Turbaco, sobre la margen derecha de la Troncal de Occidente, Cartagena, Bolívar, Colombia. La toma de muestras se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Hudson (1982), que recomienda un muestreo en zigzag, a una profundidad de 20

¹ CSB: *Estudios Previos Suministro de Fertilizantes, Microelementos, Plaguicidas Para Mantenimientos de Proyectos de Reforestación*, [en línea], 2009, Disponible en: http://www.contratos.gov.co/archivospuc1/2009/DEPREV/132039000/09-9-66086/DEPREV_PROCESO_09-9-66086_132039000_1086274.pdf, [Consulta: 5 de noviembre de 2013].

² GESP (GRUPO DE EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD POBLACIONAL): [en línea], 2009, Disponible en: http://grupogesp.org/files/BOLETIN1_2009.pdf, [Consulta: 12 de mayo de 2012].

Bolivar, Colombia. Sampling was conducted according to the methodology proposed by Hudson (1982), which recommends a zig-zag sampling at a depth of 20 cm, soil mix was storage in clean and thick bags for transportation. Collected samples were taken to the laboratory and stored at 4° C in freezer.

Extraction. The extraction of pesticides from soil samples was done using Soxhlet method (Klute y Page, 1982). For this step took 5 to 10 g sample was taken, anhydrous sodium (Na_2SO_4) sulfate was added up to a complete drying of the mixture. Subsequently, the prepared was placed in an extraction cellulose cartridge with an acetone- hexane solution (1:4) as solvent, for 20 hours. Finally, the sample was concentrated in a rotary evaporator to a final volume of 5 mL and then, with N_2 stream to a volume of 1 mL.

Chromatographic analysis. This was carried out according to the methodology used by Marín y Jaramillo (2015). The soil extracts obtained were injected (1 μ L) in the injection port of a gas chromatograph coupled to a flame ionization detector (GC-FID).

Microbiological treatment. A portion of the collected soil samples was used to achieve expression degrader OF metabolism, according to Cycoñ *et al.* (2009). Monocrotophos first dilution was made to 200 ppm, of this dilution 20 mL were taken and 300 g of soil collected were impregnated, let get dry and placed in dark at 30° C for 30 days.

300 g of soil treated with monocrotophos were sieved through a 2 mm mesh. Then, 1 g of the sieved was added to 9 mL of sterile distilled water. This dilution was the basis for successive solutions from 10⁻¹ to 10⁻⁴ using M9 medium as solvent with monocrotophos as sole carbon source (Fernández *et al.*, 2005).

The M9 minimal medium solution (containing 200 ppm monocrotophos) was prepared with hydrated sodium acid phosphate (6 g), potassium acid phosphate (3 g), ammonium chloride (4 g), sodium chloride (0.5 g), manganese sulfate heptahydrate (0.25 g), hydrated calcium chloride (0,0168 g), monocrotophos pattern (0.2g) and it was completed to 1L with distilled water and constant stirring (Elbing y Brent, 2002). The pH was adjusted to 7-7.2 with 1N hydrochloric acid and 5N sodium hydroxide and refrigerated until its usage. 16 solid phase media were prepared from M9 minimal medium solution by using agar-agar according to the manufacturer's instructions.

For isolation of bacterial microorganisms growing on M9 minimal medium, massive seeding in soil diluted in nutrient agar was made. Then it was incubated for 1 week at 36° C \pm 1. Once colonies grew, the largest ones and those with better organoleptic properties were inoculated into M9 liquid medium. One week after seeding the colonies in the liquid matrix of M9 medium, bacterial growth was monitored by UV Visible spectrophotometry (UV/VIS) and consecutive readings were made during four days. For identification, isolated bacterial colonies on solid M9 medium were taken and replicated three times on nutrient agar by using the exhaustion technique and thus ensure the isolation of each. After the third replication, colonies were subjected to Gram staining and seeded on bacterial identification kits by biochemical methods BBL Crystal ©.

cm, con mezcla del suelo y almacenamiento en bolsas limpias y gruesas para transporte. Una vez colectadas las muestras fueron llevadas al laboratorio y almacenadas a 4° C.

Extracción. Para realizar el análisis cromatográfico de las muestras, cada una de ellas fue sometida a extracción Soxhlet (Klute y Page, 1982). Para este paso se tomaron 5 a 10 g de muestra, se adicionó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) hasta desecar completamente la mezcla. Posteriormente se colocó el preparado en un cartucho de celulosa impregnado con una solución de acetona-hexano (1:4) por 20 horas. Al finalizar, la muestra se concentró mediante el uso de un rota evaporador hasta llevarla a un volumen final de 5 mL y luego con corriente de N_2 hasta un volumen de 1 mL.

Análisis cromatográfico. Después, se procedió a realizar el análisis cromatográfico con el fin de identificar los OF contenidos en ellas. De acuerdo con la metodología usada por Marín y Jaramillo (2015). Los extractos de suelos obtenidos se inyectaron 1 μ L en el puerto de inyección de un Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización en llama (GC-FID).

Tratamiento Microbiológico. Una parte de las muestras de suelo colectadas fue utilizada para lograr la expresión del metabolismo degradador de OF, de acuerdo con lo recomendado por Cycoñ *et al.* (2009). Primero se realizó una dilución de Monocrotofós a 200 ppm, de esta dilución se tomaron 20 mL y se impregnaron 300 g de suelo colectado, se dejó secar y se colocaron en oscuridad a 30° C por 30 días.

Se tamizaron 300 g de suelo tratado con monocrotofos utilizando una malla de 2 mm. Luego fue adicionado 1g del tamizado en 9 mL de agua destilada estéril. Esta dilución fue la base para la realización de soluciones sucesivas de 10⁻¹ a 10⁻⁴ utilizando como solvente medio mínimo M9 con monocrotofos como única fuente de carbono (Fernández *et al.*, 2005).

La solución de medio mínimo M9 (con un contenido de monocrotofos a 200 ppm) fue preparada con Fosfato ácido de sodio hidratado (6 g), Fosfato ácido de potasio (3 g), Cloruro de amonio (4 g), Cloruro de sodio (0,5 g), Sulfato de manganeso hepta hidratado (0,25 g), Cloruro de calcio hidratado (0,0168 g), Patrón de monocrotofos (0,2 g) y se completó a 1L con agua destilada y agitación constante (Elbing y Brent, 2002). El pH se ajustó a 7-7,2 con ácido clorhídrico 1 N e hidróxido de sodio 5 N y se refrigeró hasta su utilización. De la solución de medio mínimo M9 se prepararon 16 medios de fase sólida utilizando agar-agar, siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante.

Para el aislamiento de microorganismos bacterianos con capacidad de crecimiento en medio mínimo M9 fue realizada una siembra masiva del suelo diluido en agar nutritivo. Luego, el mismo fue llevado a incubación por 1 semana a una temperatura de 36°C \pm 1. Una vez se comprobó el crecimiento de las colonias, las más grandes y con mejores cualidades organolépticas fueron inoculadas en el medio líquido M9. Transcurrida una semana, después de la siembra de las colonias en la matriz líquida de medio M9, se verificó el crecimiento bacteriano mediante la espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV/VIS) y se realizaron lecturas consecutivas durante cuatro días siguientes.

Para la identificación, las colonias bacterianas aisladas en medio sólido M9 fueron tomadas y repicadas en tres oportunidades en agar nutritivo utilizando la técnica por agotamiento y garantizar así el aislamiento de cada una. Después del tercer repique, las colonias fueron sometidas a tinción de Gram y sembradas en kits de identificación bacteriana por métodos bioquímicos BBLCrystal©.

Isolated colonies, purified and biochemically characterized, were genotyped by 16S ribosomal gene amplification through polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of a 1465 pb fragment. Once fragment sequences were obtained they were assembled and compared to sequences deposited in the databases NCBI (National Center for Biotechnology Information) and RDP (Ribosomal Database Project). Commercially procedures performed by Corpogen (Bogotá-Colombia).

Validation of the OF pesticide degradation by bacterial action. Degrading activity verification of isolated and identified bacteria was performed by measuring the OF concentration by using GC/FID. The bacterial strains were seeded in the liquid matrix M9 using Eppendorf © tubes and they were incubated at $36 \pm 1^\circ \text{C}$ for 7 days. The initial value of concentration of M9 with Monocrotophos to 200 ppm was taken as reference and 24 hours later the first measurement of concentration with the chromatograph was made, with two subsequent measurements every 24 hours for 3 days.

Statistic analysis. The data obtained were analyzed using descriptive statistics of continuous variables for normal distribution and homogeneity of variance using the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett (Allen, 1976), respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

The soils analyzed showed the presence of pesticides OF. Three bacterial strains with acceptable rates of growth and ability to survive in saturated media with OF (pattern OF Monocrotophos), were obtained (Table 1). Once isolated and purified the strains present in the M9 minimal medium were identified as Gram negative bacilli not sporulated suggestive of Enterobacteriaceae. After confirming the acceptable growth of bacteria in the presence of an OF pattern as sole carbon source, both biochemical and molecular identification were performed to determine genus and species (Table 2).

Las colonias aisladas, purificadas y caracterizadas bioquímicamente, fueron genotipificadas, mediante la amplificación del gen ribosomal 16S por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación de un fragmento de 1465 pb. Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos se ensamblaron y compararon con las secuencias depositadas en las bases de datos de NCBI (National Center For Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project). Procedimientos realizados comercialmente por CORPOGEN (Bogotá-Colombia).

Validación de la degradación del pesticida OF por acción bacteriana. La verificación de la actividad degradadora de las bacterias aisladas e identificadas, fue realizada mediante la medición de la concentración de OF usando GC/FID. Las cepas bacterianas fueron sembradas en la matriz líquida de medio M9 utilizando tubos Eppendorf © e incubadas a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 7 días y se tomó como referencia el valor inicial de concentración del medio M9 con Monocrotophos a 200 ppm y 24 horas más tarde se realizó la primera medición de concentración con el cromatógrafo, con dos mediciones posteriores espaciadas cada una por 24 horas durante 3 días.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de estadística descriptiva de variables continuas, para distribución normal y homogeneidad de varianzas utilizando los test de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett (Allen, 1976), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los suelos analizados evidenciaron la presencia de pesticidas OF, se obtuvieron tres cepas bacterianas con tasas de crecimiento aceptables y con capacidad de sobrevivir en medios saturados con OF (patrón de OF Monocrotophos) (Tabla 1). Una vez aisladas y purificadas las cepas presentes en el medio mínimo M9 se identificaron como bacilos Gram negativos no esporulados sugestivos de Enterobacterias. Luego de confirmar el crecimiento aceptable de las bacterias en presencia de un patrón de OF como única fuente de carbono, las mismas fueron sometidas a identificación tanto bioquímica como molecular para determinar género y especie, del cual fueron obtenidos los resultados sintetizados en la Tabla 2.

TABLE 1. Bacterial growth of the strains under study
TABLA 1. Crecimiento bacteriano de las cepas en estudio

Days of incubation/ Días de incubación	Optical density */ Densidad óptica*		
	Strain 1 / Cepa 1	Strain 2 / Cepa 2	Strain 3 / Cepa 3
1	0.396±0.004	0.291±0.008	0.199±0.019
2	0.399±0.004	0.300±0.008	0.218±0.019
3	0.415±0.004	0.306±0.008	0.266±0.019
4	0.429±0.004	0.319±0.008	0.249±0.019
5	0.434±0.004	0.400±0.008	0.419±0.019
6	0.449±0.004	0.415±0.008	0.525±0.019
7	0.485±0.004	0.430±0.008	0.571±0.019

*The data are presented as optical density ± standard error. / *Los datos son presentados como densidad óptica ± error estándar.

TABLE 2. Biochemical behavior of isolate strains obtained by BBL Crystal©kit
TABLA 2. Comportamiento bioquímico de cepas aisladas obtenido con BBL Crystal©kit

Biochemistry / Bioquímica	Strain1/ Cepa1	Strain2/ Cepa2	Strain3/ Cepa3
Arabinose degradation	+	+	-
Mannose degradation	-	+	-
Sucrose Degradation	+	+	-
Cellulose degradation	-	-	-
Degradation rhamnose	+	+	-
Degradation sorbitol	+	+	-
Production of mannitol	-	+	-
Degradation adonitol	+	+	-
Degradation galactose	+	+	+
Production of inositol	+	-	-
Production of p-n-p phosphate	-	+	-
Production of p-n-p α - β glucoside:	+	-	-
Production of p-n-p β galactoside	+	+	-
Proline production nitroanilide	+	-	+
Production of p-n-p diphosphate	+	-	-
Production of p-n-p xiloxida	+	+	-
Production of p-n-p arabinoside α -	+	+	-
Production of p-n-p phosphorylcholine	-	-	-
Production of p-n-p glucuronic β	-	-	-
Production of p-n-p N acetyl glucosaminide	-	+	-
Γ production glutamyl-L nitroanilide	+	+	+
Production of esculin	+	-	-
Phenylalanine production	-	-	-
Urea degradation	-	-	+
Degradation glycine	-	-	+
Degradation citrate	+	+	+
Degradation malonate	+	+	+
Tetrazolium degradation:	+	+	+
Arginine degradation	+	+	+
Lysine degradation	+	+	+

Biochemical characterization of C1, C2 and C3 strains showed the presence of three different species: *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. However, the results of sequencing the 16S ribosomal gene, located C1 and C2 strains relative to *Enterobacter* genus, which differs from that found with Crystal® BBL identification techniques. By comparing these strains similarities were found

La caracterización bioquímica de las cepas C1, C2 y C3 mostraron la presencia de tres especies diferentes: *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente. Sin embargo, los resultados de la secuenciación del genribosomal 16S, ubican a las cepas C1 y C2 relativas con el género *Enterobacter*, lo que difiere de lo encontrado con las técnicas de identificación BBL Crystal®. Al comparar estas cepas se encontraron similitudes

in colony morphology, microscopic characters, not oxidative metabolism, being not undemanding facultative anaerobic and having similar metabolism. Even taxonomically the two species are part of the Enterobacteriaceae family. It was found that between the C1 and C2 Strains there was genetic similarity within 99 and 100% with *Enterobacter cancerogenus* and other unidentified species, possibly, because a single gene and not the entire genome of the species is being used.

The 16S gene sequence analysis showed for strain 1, a sequence of 1475 bp that relates to 99% with *Enterobacter* species, among which are *Enterobacter cancerogenus* and other unidentified. However, the classifier RDP (Ribosomal Database Project) only arose to an unclassified sequence of Enterobacteriaceae group (Figure 1). As for strain 2, the results of taxonomic analysis indicate that the sequence 1477 pb, has a 99% identity in 100% of its length, with sequences belonging to several species of *Enterobacter* genus and other unidentified, being nearer to *Enterobacter cancerogenus* (Figure 1). Finally, strain 3 had a 99% of identity with several species of *Pseudomonas*, being genetically closer to a sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* species (Figure 1).

The liquid culture media were analyzed by GC/FID to determinate present of organophosphorus pesticide. Besides of the three strains tested a white or negative control was done, in which the medium was used unseeded. The information obtained from the GC/FID analysis, which monitored the degradation of monocrotophos standard by the three bacterial isolates (C1, C2 and C3) and the negative control is shown in Table 3. After 72 hours in incubation was evidenced a marked decreased pesticide, degradation monocrotophos standard was up to 100% after 48 hours of incubation (Figure 2).

The degrading power of the soil isolated strains was demonstrated by finding optical densities near 0.7, in similar research, the optical densities found after one or more weeks of growth were 0.7 to 10 (Cycoñ, *et al.*, 2009; (Cycoñ *et al.*, 2009, 2013; Acuña *et al.*, 2010). Even in bacterial strains of the same taxonomic family used in this research (Cycoñ *et al.*, 2009, 2013). The differences found between the two methods of identification can be attributed to genetic variability due to exchange of the material between species (Winn & Koneman, 2006).

The degrading power of the soil isolated strains was checked through degradation monocrotophos. Apparently, this process produces secondary metabolites, although they are also considered pollutants. Probably, these are degraded by the same metabolic pathway, to achieve harmless compounds. The Monocrotophos biotransformation develops through three different metabolic reactions: N-demethylation, O-demethylation, and a bond cleavage of vinyl phosphate. Generally, monocrotophos is metabolized in N-hydroxy-methylamide (Rao, 2006) and n-metilacetoamida. The latter tends to accumulate in contaminated soils (Gundi & Reddy, 2006). Monocrotophos is converted into hydroxymethyl using oxidative metabolic pathway (Hodgson, 2012). Metabolites produced by the bacteria isolated from soil could be generating inorganic phosphate and bacterial enzymes such as phosphatase, which enhance its ability to capture such molecules in phosphate free media, allowing the growth of the colonies (Ríos & Solari, 2010).

en cuanto a la morfología de colonias, caracteres microscópicos, metabolismo no oxidativo, siendo anaerobias facultativas no exigentes y metabolismo muy similar. Incluso taxonómicamente las dos especies hacen parte de la familia Enterobacteriaceae. Se encontró que entre las Cepas C1 y C2 se obtuvo una similitud genética entre 99 y 100% con *Enterobactercancerogenus* otras especies no identificadas. Posiblemente, debido a que se está utilizando un solo gen y no el genoma completo de la especie.

Los análisis de la secuencia del gen 16S mostraron, para la cepa 1, una secuencia de 1475 pb, que la relacionan en un 99% con especies del género *Enterobacter*, entre las cuales está *Enterobactercancerogenus* con otras no identificadas. Sin embargo, el clasificador de RDP (*Ribosomal Database Project*) sólo llegó hasta una secuencia no clasificada del grupo *Enterobacteriaceae* (Figura 1). En cuanto a la cepa 2, los resultados del análisis taxonómico indican que la secuencia de 1477 pb, tiene un 99% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias pertenecientes a varias especies del género *Enterobacter* con otras no identificadas. Siendo más cercana a la especie *Enterobactercancerogenus* (Figura 1).

Finalmente, la cepa 3 tuvo un 99% de identidad con varias especies del género *Pseudomonas* siendo más cercana genéticamente a una secuencia de la especie *Pseudomonasaeruginosa* (Figura 1).

Los medios de cultivo líquidos fueron sometidos a GC/FID para determinación del pesticida presente. Además de las tres cepas evaluadas, se tuvo un Blanco o Control Negativo, en el cual se utilizó el medio sin sembrar. La información obtenida de la GC/FID que monitoreó la degradación del estándar monocrotophos por parte de las tres cepas bacterianas aisladas (C1, C2 y C3) y el Blanco de reacción se muestra en la Tabla 3. Transcurridas 72 h de incubación se evidenció una marcada disminución del pesticida, la degradación del estándar de monocrotophos fue de hasta un 100% transcurrida 48 horas de incubación (Figura 2).

La capacidad de crecimiento de las cepas aisladas quedó demostrada al encontrar densidades ópticas cercanas a 0,7. En investigaciones similares, las densidades ópticas encontradas tras una o más semanas de crecimiento fueron de 0,7 hasta 10 (Cycoñ *et al.*, 2009, 2013; Acuña *et al.*, 2010). Incluso en cepas bacterianas de la misma familia taxonómica que la utilizada en esta investigación (Cycoñ *et al.*, 2009, 2013). Las diferencias encontradas entre los dos métodos de identificación pueden atribuirse a la variabilidad genética debido a intercambio del material entre las especies (Winn y Koneman, 2006).

El poder degradativo de las cepas aisladas del suelo, fue comprobado a través de la degradación de monocrotophos. Al parecer este proceso produce metabolitos secundarios que, aunque también son considerados contaminantes, probablemente estos sean degradados por la misma vía metabólica, hasta lograr inocuidad. La biotransformación de monocrotophos se desarrolla por medio de tres diferentes reacciones metabólicas: N-desmetilación, O-desmetilación, y la escisión del enlace fosfato de vinilo. Generalmente el monocrotophos es metabolizado en N-hidroxi-metilamida (Rao, 2006) y n-metilacetoamida. Este último tiende a acumularse en suelos contaminados (Gundi y Reddy, 2006). Monocrotophos es convertido en hidroximetilo utilizando la ruta metabólica oxidativa (Hodgson, 2012). Los metabolitos producidos por las bacterias aisladas del suelo podrían estar generando fosfato inorgánico y enzimas bacterianas como la fosfatasa, lo cual potencian su capacidad de captar este tipo de moléculas en medios libres de fosfato, permitiendo el crecimiento de las colonias (Ríos y Solari, 2010).

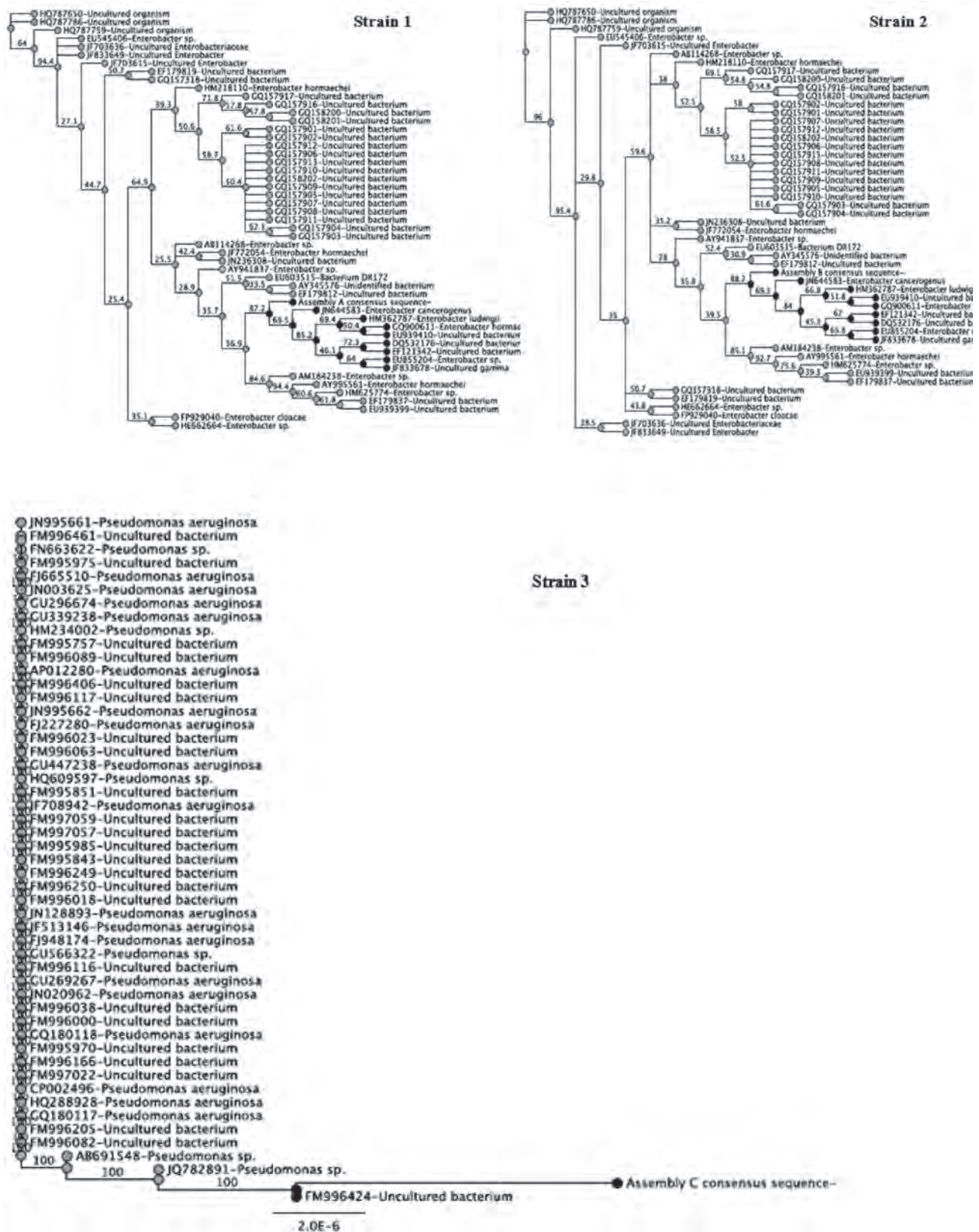


FIGURE 1. Tree of distances constructed from 50 best arrangements regarding the NCBI database. The nodes (*) corresponding to the query sequence belonging to clade Enterobacter cancerogenus / Enterobacter hormaechei (Strain 1 and 2) and Pseudomonas aeruginosa (strain 3) are shown in the box. FIGURA 1. Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores arreglos con respecto a la base de datos de NCBI. En el recuadro se muestran los nodos (*) correspondientes a la secuencia problema, correspondiente al clado de Enterobacter cancerogenus / Enterobacter hormaechei (Cepa 1 y 2) y Pseudomonas aeruginosa (Cepa 3).

TABLE 3. Percentage reduction of monocrotophos standard by the isolates and the white reaction
TABLA 3. Porcentaje de reducción del estándar monocrotofos por parte de las cepas aisladas y el blanco de reacción

	Area / Área		Average / Promedio	SD / DS	Reduction, % / Reducción %
	Replicate 1/ Replica 1	Replicate2 / Replica 2			
White day 0	2179	2207	2193	20	
White day 1	1866	1750	1808	82	
White day 2	1803	1400	1602	285	47%
White day 3	1308	1240	1274	48	
White day 4	1206	1100	1153	75	
C1 day 0	2219	2103	2161	82	
C1 day 1	0	0	0	0	
C1 day 2	0	0	0	0	100%
C1 day 3	0	0	0	0	
C1 day 4	0	0	0	0	
C2 day 0	2186	2190	2188	3	
C2 day 1	0	0	0	0	
C2 day 2	0	0	0	0	100%
C2 day 3	0	0	0	0	
C2 day 4	0	0	0	0	
C3 day 0	2276	2267	2272	6	
C3 day 1	0	0	0	0	
C3 day 2	0	0	0	0	100%
C3 day 3	0	0	0	0	
C3 day 4	0	0	0	0	

Regarding the rate of decomposition and disappearance of organophosphates, carbamates and other compounds, it is only relative, since some factors such as the chemical structure of the compound, soil type, organic matter content, content and nature of clay minerals in the soil, granulometric composition, pH, moisture and temperature can influence decisively in the degree of persistence (Bhadbhade *et al.*, 2002). Pierre & Betancourt (2007) showed that OF pesticides used in agriculture generate bioaccumulation and can remain as contaminants for a long period of time (Abo-El-Seoud *et al.*, 1995; Pierre & Betancourt, 2007).

En cuanto a la velocidad de descomposición y desaparición de los compuestos organofosforados, carbamatos y otros, es sólo relativa, ya que algunos factores como la propia estructura química del compuesto, tipo de suelo, contenido en materia orgánica, contenido y naturaleza de los minerales de la arcilla presentes en el suelo, composición granulométrica, pH, humedad y temperatura pueden influir decisivamente en el grado de persistencia. Pierre y Betancourt (2007) demostraron que los pesticidas OF utilizados en agricultura generan bioacumulación y pueden permanecer como contaminantes por un período de tiempo prolongado (Abo-El-Seoud *et al.*, 1995; Pierre y Betancourt, 2007).

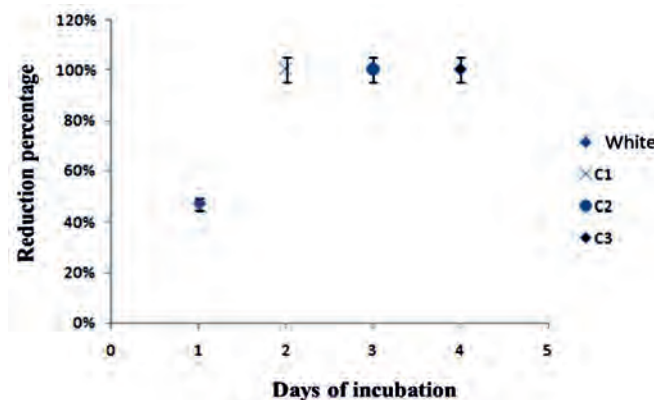


FIGURE 2. Percentage reduction of monocrotophos standard by the strains under study (C1, C2, C3).
 FIGURA 2. Porcentaje de reducción del estándar monocrotofos por parte de las cepas en estudio (C1, C2, C3).

CONCLUSION

- Three bacterial strains (C1, C2, C3) were isolated from soils contaminated by organophosphate pesticides. According to the study at the molecular level of gene ribosomal 16S, it was determined that cultured bacteria from C1, C2 and C3 samples belong to the Enterobacteriaceae family. C1 and C2 had a genetic similarity between 99 and 100% with *Enterobacter cancerogenus* and other unspecified species. However, closer interaction with each of them is quite different, so it can be concluded that they may be subspecies.
- Cultured bacteria of sample C3 were located within the Enterobacteriaceae family with a degree of similarity of 99 to 100% with the species *Pseudomonas aeruginosa*. These species demonstrated their ability to degrade pesticides OF.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the University of Cartagena, with strong support from the Research Vice-Rector. We thank Agrochemical Research Group of the Faculty of Natural Sciences. To Orlando de la Rosa for his collaboration in chromatographic analysis. To chemists Hector Pertuz A, and Fernando Fernandez.

REFERENCES/REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-EL-SEoud, M.A.; SHAMS-EL-DIN, A.M.; DANIAL, L.N.; AHMED, S.M.: "Residues and persistence of some organophosphorus insecticides applied to cabbage plants", *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 29(6): 555-561, 1 de julio de 1995, ISSN: 0323-5408, DOI: 10.1080/03235409509383145.
- ABRAHAM, J.; SILAMBARASAN, S.; LOGESWARI, P.: "Simultaneous degradation of organophosphorus and organochlorine pesticides by bacterial consortium", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(5): 2590-2596, septiembre de 2014, ISSN: 1876-1070, DOI: 10.1016/j.jtice.2014.06.014.
- ACUÑA, A.; PUCCI, G.; MORALES, M.J.; PUCCI, O.: "Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina", *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1): 29-36, junio de 2010, ISSN: 1315-2556.
- ALEGRETT, S.: *Manual Técnico Andino para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola*, [en línea], no. 630, Inst. Secretaria General de la Comunidad Andina, Colombia, p. 3, 25 de junio de 2002, Disponible en: http://www.fedearroz.com.co/normas/RES_630__MANUALPLAGUICIDAS.pdf, [Consulta: 26 de mayo de 2016].
- ALLEN, M.E.: *Kolmogorov-Smirnov test for discrete distributions*, [en línea], Naval Postgraduate School, Master Thesis, Monterey, California, 93 p., marzo de 1976, Disponible en: <http://calhoun.nps.edu/handle/10945/17830>, [Consulta: 26 de mayo de 2016].
- BRUINSMA, J.; FAO (eds.): *World agriculture: towards 2015/2030*, no. solc. HD1415.W56 2003, Ed. Earthscan Publications, London, 432 p., 2003, ISBN: 978-92-5-104835-1.
- CYCOŃ, M.; WÓJCIK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.: "Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil", *Chemosphere*, 76(4): 494-501, julio de 2009, ISSN: 0045-6535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.03.023.
- CYCOŃ, M.; ŻMIJOWSKA, A.; WÓJCIK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.: "Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils", *Journal of Environmental Management*, 117: 7-16, 15 de marzo de 2013, ISSN: 0301-4797, DOI: 10.1016/j.jenvman.2012.12.031.
- DAS, S.; ADHYA, T.K.: "Degradation of chlorpyrifos in tropical rice soils", *Journal of Environmental Management*, 152: 36-42, 1 de abril de 2015, ISSN: 0301-4797, DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.01.025.
- DE SILVA, H.J.; SAMARAWICKREMA, N.A.; WICKREMASINGHE, A.R.: "Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure?", *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(9): 803-806, PMID: 16806335, 9 de enero de 2006, ISSN: 0035-9203, 1878-3503, DOI: 10.1016/j.trstmh.2006.05.001.
- EDDLESTON, M.; PHILLIPS, M.R.: "Self poisoning with pesticides", *British Medical Journal*, 328(7430): 42-44, PMID: 14703547, PMCID: PMC313909, 3 de enero de 2004, ISSN: 1756-1833, DOI: 10.1136/bmj.328.7430.42.
- EDDLESTON, M.; STREET, J.M.; SELF, I.; THOMPSON, A.; KING, T.; WILLIAMS, N.; NAREDO, G.; DISSANAYAKE, K.; YU, L.-M.; WOREK, F.; JOHN, H.; SMITH, S.; THIERMANN, H.; HARRIS, J.B.; EDDIE CLUTTON, R.: "A role for

CONCLUSIÓN

- Se aislaron tres cepas bacterianas (C1, C2, C3) de suelos contaminados por pesticidas organofosforados. De acuerdo con el estudio a nivel molecular del gen ribosomal 16S, se pudo determinar que las bacterias cultivadas de las muestras C1, C2 y C3 pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, obteniendo las dos primeras una similitud genética entre 99 y 100% con *Enterobacter cancerogenus* y otras especies no especificadas, sin embargo, la interacción más acorde con cada una es muy diferente, por lo que puede ser concluido que las mismas podrían ser subspecies. Las bacterias cultivadas de la muestra C3, fueron ubicadas dentro de la Familia Enterobacteriaceae, con un grado de similitud del 99 a 100% con el de la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Estas especies demostraron su capacidad para la degradación de pesticidas OF.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Universidad de Cartagena, con el apoyo decidido de la Vicerrectoría de Investigaciones. Agradecemos al Grupo de Investigaciones Agroquímicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. A Orlando de la Rosa por su colaboración en los análisis cromatográficos. A la Universidad de San Buenaventura por el préstamo de sus instalaciones. A los Químicos Héctor Pertúz y Fernando Fernández.

solvents in the toxicity of agricultural organophosphorus pesticides”, *Toxicology*, 294(2–3): 94-103, 11 de abril de 2012, ISSN: 0300-483X, DOI: 10.1016/j.tox.2012.02.005.

ELBING, K.; BRENT, R.: “Media Preparation and Bacteriological Tools”, [en línea], En: Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. y Struhl, K. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, agosto de 2002, ISBN: 978-0-471-14272-0, Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142727.mb0101s59>, [Consulta: 26 de mayo de 2016].

FERNÁNDEZ, L.A.; ZALBA, P.; GÓMEZ, M.A.; SAGARDOY, M.A.: “Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera”, *Ciencia del suelo*, 23(1): 31-37, julio de 2005, ISSN: 1850-2067.

GUNDI, V.A.K.B.; REDDY, B.R.: “Degradation of monocrotophos in soils”, *Chemosphere*, 62(3): 396-403, enero de 2006, ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.076.

HODGSON, E. (ed.): *Pesticide biotransformation and disposition*, no. solc. RA1270.P4 P465 2012, Ed. Academic Press, 1.ª ed., Waltham, MA, London, 217 p., OCLC: ocn773962928, 2012, ISBN: 978-0-12-385481-0.

HUDSON, N.: “Contaminación y erosión del suelo”, En: *Conservación del suelo*, Ed. Reverté, S.A., Barcelona, España, pp. 1-12, OCLC: 503173613, 1982, ISBN: 978-84-291-1027-2.

KLUTE, A.; PAGE, A.L. (eds.): *Methods of soil analysis*, no. solc. S593 .M4453 1982, ser. Agronomy, no. ser. 9, Ed. American Society of Agronomy : Soil Science Society of America, 2.ª ed., Madison, Wis, 1159 p., 1982, ISBN: 978-0-89118-088-3.

MARÍN, F.L.; JARAMILLO, B.: “Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina”, *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2): 179-185, junio de 2015, ISSN: 0717-7518, DOI: 10.4067/S0717-75182015000200010.

MAVDT (MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL): *Medidas ambientales y otras determinaciones*, [en línea], vol. 1247, 30 de junio de 2006, Disponible en: http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_0423_270209.pdf, [Consulta: 10 de junio de 2012].

MOJICA, A.; GUERRERO, J.A.: “Extracción de residuos de plaguicidas en suelos asistida por ultrasonido”, *Revista Colombiana de Química*, 39(3): 371-387, diciembre de 2010, ISSN: 0120-2804.

MURCIA, A.M.; STASHENKO, E.: “Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia”, *Agro Sur*, 36(2): 71-81, agosto de 2008, ISSN: 03048802, DOI: 10.4206/agrosur.2008.v36n2-03.

PIERRE, F.; BETANCOURT, P.: “Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de Quíbor, Venezuela”, *Bioagro*, 19(2): 69-78, agosto de 2007, ISSN: 1316-3361.

RAO, J.V.: “Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos”, *Chemosphere*, 65(10): 1814-1820, diciembre de 2006, ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.015.

RÍOS, B.J.C.; SOLARI, S.: “Biomonitorización de plaguicidas: ¿Una necesidad del país?”, *Revista Médica de Chile*, 138(4): 515-518, abril de 2010, ISSN: 0034-9887, DOI: 10.4067/S0034-98872010000400019.

WINN, W.C.; KONEMAN, E.W. (eds.): *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, no. solc. QR67 .C64 2006, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 6.ª ed., Philadelphia, 1535 p., OCLC: ocm58598402, 2006, ISBN: 978-0-7817-3014-3.

ZHANG, W.; ASIRI, A.M.; LIU, D.; DU, D.; LIN, Y.: “Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 54: 1-10, febrero de 2014, ISSN: 01659936, DOI: 10.1016/j.trac.2013.10.007.

Received: 17/12/2015.

Approved: 03/06/2016.

Beatriz E. Jaramillo Colorado, profesora e investigadora, Universidad de Cartagena, Campus San Pablo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Grupo de Investigaciones Agroquímicas, Cartagena, Colombia. E-mail: bjaramillo@unicartagena.edu.co

Adriana Bermúdez Tobón, E-mail: bjaramillo@unicartagena.edu.co

Irina Tirado Ballesteras, E-mail: bjaramillo@unicartagena.edu.co

Note: the mention of commercial equipment marks, instruments or specific materials obey identification purposes, not existing any promotional commitment with relationship to them, neither for the authors nor for the editor.