

BIODEGRADACIÓN DE CARBOFURAN POR UNA CEPA DE *Trichoderma* sp. AUTÓCTONA Y SU POTENCIAL USO PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

CARBOFURAN BIODEGRADATION BY AN AUTOCHTHONOUS *Trichoderma* sp. AND ITS POTENTIAL USE FOR THE BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED SOILS

Alejandra Eunice Romero^{1*}, Luciano Matías Yañez¹, Marcos Javier Maldonado¹, Daniela Alejandra Choque¹ y María Elisa Natalia Ávila Carreras¹

¹Grupo de Investigación Química Aplicada. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy (UNJu). Alberdi N° 47, San Salvador de Jujuy. Jujuy, Argentina. (C.P. 4600)

*Autor para correspondencia:
euniceromero@fca.unju.edu.ar

Licencia:

[Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](#)

Período de Publicación:

Diciembre 2021

Historial:

Recibido: 02/07/2021

Aceptado: 16/10/2021

RESUMEN

El Carbofuran es un plaguicida N-metilcarbamato, inestable que se hidroliza en el ambiente y sus residuos se han detectado en aguas subterráneas. Los hongos celulolíticos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* entre otros son conocidos por tolerar y biodegradar contaminantes tóxicos como los plaguicidas (Clordano, Lindano, DDT) e hidrocarburos. El objetivo de este trabajo consistió en aislar una cepa de *Trichoderma* autóctona de los suelos de Maimará (Jujuy) con capacidad de tolerar el Carbofuran e investigar su viabilidad frente al agroquímico cuya permanencia fue determinada experimentalmente. En condiciones de laboratorio se determinó la concentración de Carbofuran en suelos de Maimará, además se realizó una curva de degradación abiótica del tóxico. También se aisló la cepa *Trichoderma* sp. del suelo antes mencionado y se la expuso a diferentes concentraciones de Carbofuran durante 120 h, donde se midió el desarrollo micelial (DM), se calculó el porcentaje de inhibición del desarrollo (PID), se cuantificó el número de conidios y el porcentaje de germinación.

El Carbofuran se degradó con una cinética de primer orden en un 64 %, habiendo transcurrido 45 días desde la aplicación, el tiempo de vida media fue 33 días. La cepa *Trichoderma* sp., se expuso a concentraciones de 35, 98, 177, 315 mg/L de Carbofuran, donde no se observó inhibición en el crecimiento y el conteo de conidios no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) respecto al control. En todos los tratamientos el porcentaje de germinación fue aproximadamente de un 100% respecto al control.

Palabras clave: insecticida carbámico, curva de degradación, *Trichoderma*, tolerancia, viabilidad, germinación

SUMMARY

Carbofuran is an unstable N-methylcarbamate pesticide that hydrolyses in the environment and its residues have been detected in groundwater.

The cellulolytic fungi such as *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* and *Trichoderma* among others are recognized for tolerating and biodegrading toxic contaminants such as pesticides (Chlordane, Lindane, DDT) and Hydrocarbons. The objective of this work was to isolate an autochthonous microorganism from Maimará soils (Jujuy) with the capacity to tolerate Carbofuran, and to research its viability in the presence of the agrochemical whose permanence was determined experimentally. Carbofuran concentration in Maimará soils was determined under laboratory conditions. In addition, a new curve of toxic abiotic degradation was carried out. The *Trichoderma* sp. strain was isolated from the aforementioned soil and exposed to Carbofuran for 120 h, the mycelial development (MD) was measured, the percentage of development inhibition (PDI) was calculated, development inhibition percentage was calculated, the number of conidia and the percentage of germination were quantified. Carbofuran was degraded to 64% with first-order kinetics after 45 days of application, the average life time was 33 days. The *Trichoderma* sp. strain was exposed to 35, 98, 177, 315 mg / L concentrations of Carbofuran and no inhibition was observed, the conidia count showed no significant difference ($p > 0.05$) according to control. The germination percentage, in all the treatments, was close to 100% according to control.

Keywords: carbamic insecticide, degradation curve, germination, tolerance, *Trichoderma*, viability

INTRODUCCIÓN

El uso de plaguicidas en la agricultura se incrementó drásticamente en las últimas décadas. La mayoría de estos agroquímicos no impactan sólo en los organismos blanco para los que fueron diseñados, sino también pueden detectarse en suelos, agua, organismos benéficos e incluso en alimentos (Arias Estévez, López-Periago, Martínez-Carballo, Simal-Gándara, Mejuto & García-Río, 2007, Fang, Xiang, Hao, Chu, Pan & Yu, 2008; Pimmata, Reungsang, Plangklang et al., 2013; Silambarasan & Jayanthi, 2013).

El Carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilcarbamato) es un plaguicida N-metilcarbamato (N-MC), inestable, se hidroliza en el ambiente y sus residuos han sido detectados en aguas subterráneas como consecuencia de su alta movilidad en los suelos

(Yang, Chen, Hu, Hao, Geng & Zhang, 2011; Dhanasekara, Attanayake, Herath, Nanayakkara, Senaratne, Indrarathne & Weerasooriya, 2015). Su empleo tiene por objeto combatir insectos y nematodos en el suelo y está clasificado dentro del rango de toxicidad moderada a alta. Para los organismos blanco es altamente tóxico por inhalación e ingestión y moderadamente tóxico por absorción dérmica. Este N-MC afecta el sistema nervioso periférico inhibiendo reversiblemente la acetilcolinesterasa en humanos y animales. Se metaboliza en el hígado y se excreta por orina (Romero, Tschambler, Saavedra, De Pascuale & Bovi Mitre, 2012). Se aplica en semillas y raíces (CASAFE, 2015) y se detectaron aplicaciones aéreas (sobre el follaje), principalmente en apio. Estas aplicaciones en hortalizas son tal vez las que representan un mayor riesgo para los consumidores, ya que las mismas se realizan semanas antes de la cosecha (RAP-AL, 2008; Valencia, Potosí, Valencia & Bravo,

2010; Wierna, Ruggeri, Escalera, Tschambler & Bovi Mitre, 2016).

En Tailandia, el Carbofuran fue utilizado en los campos de arroz (Pimmata et al., 2013). En la región andina de Venezuela, se aplicó en cultivos de hortalizas, en forma indiscriminada (Blanco, Marquina, Castro & 2013) y en Colombia se lo empleó en cafetales, caña de azúcar, frutas, entre otros (Valencia et al., 2010). En la Quebrada de Humahuaca provincia de Jujuy – Argentina se detectó residuos de Carbofuran en hojas de apio (Wierna et al., 2016) y el 75% de los productores utilizan el agroquímico en sus sistemas productivos hortícolas (Romero et al., 2012).

Los suelos de la Quebrada de Jujuy son moderadamente alcalinos y salinos, con bajo contenido orgánico, con una pendiente del 0 al 1% y una erosión ligera. Se los caracteriza como incipiente desarrollo con perfil A (muy somero) - C (horizonte pedregoso con clastos que pertenecen a la roca madre), de textura medianamente gruesa (Zamora Gómez, Abdo, Achem, Mamani, Quispe, De Brito, Hermida, Torrejon, Binder & José, 2013).

Los métodos tradicionales para controlar y mitigar la contaminación en cualquier tipo de suelos son costosos, poco eficaces y engorrosos. La remediación biológica, es una alternativa viable y recomendable frente a los métodos de restauración químicos o físicos (Yang, Chen, Hu, Hao, Geng & Zhang, 2011; Khalid, Hashmi & Khan, 2016). Los microorganismos pueden transformar los contaminantes orgánicos, en compuestos con menor o mayor toxicidad en relación al compuesto original (biodegradación) o pueden degradarlo completamente, lo que implica su mineralización hasta compuestos inocuos como agua y dióxido de carbono (biorremediación) (Argumedo-Delira, Alarcón, Ferrera-Cerrato & Peña-Cabriales, 2009).

Los hongos no ligninolíticos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* entre otros, son reconocidos por tolerar y biodegradar contaminantes tóxicos, gracias al sistema enzimático extracelular que poseen, el cual es capaz de catalizar reacciones de degradación de compuestos aromáticos como los plaguicidas (Clordano, Lindano, DDT) e hidrocarburos (Stamatiu-Sanchez, Alarcon, Ferrera-Cerrato, Nava Díaz, Sanchez Escudero, Cruz Sanchez & Castillo, 2015; Tejomyee, Bhalerao, Pravin & Puranik, 2007).

La persistencia de los plaguicidas en el ambiente

permite calcular la vida media de los mismos. La vida media es una medida del tiempo requerido para que la concentración del agroquímico se reduzca a la mitad del valor original a lo largo de los procesos de degradación química o biológica (Silambarasan y Jayanthi, 2013).

Ante lo mencionado, el objetivo de este trabajo consistió en aislar un microorganismo autóctono de los suelos de Maimará (Jujuy) con capacidad de tolerar el Carbofuran e investigar su viabilidad frente al agroquímico cuya permanencia en los suelos fue determinada experimentalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plaguicida: Carbofuran con un 99% de pureza Pestanal[®] Analytical Standard. Las soluciones stock de Carbofuran fueron preparadas en metanol y también la fase móvil del Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

Reactivos: Metanol, acetonitrilo y acetato de etilo, grado analítico.

Muestras de Suelos y análisis fisicoquímico: Las muestras de suelo fueron recolectadas de predios hortícolas a una profundidad de 0 - 20 cm, en la localidad de Maimará, Departamento Tilcara, (Jujuy – Argentina), siguiendo lo establecido en las normas IRAM 2948 – 1 (IRAM 1999). El análisis del suelo se realizó a partir de muestras compuestas de lotes productivos. La caracterización del suelo se llevó a cabo mediante las determinaciones de clase textural USDA, el contenido de materia orgánica, pH y conductividad eléctrica (CE) en extracto saturación (conductimetría) se realizó en el laboratorio de análisis de suelo Finca Experimental La Posta de Latser S.A.

Método de cuantificación de Carbofuran en suelos enriquecidos: Se empleó el método de Valencia y otros (2010), las muestras de suelos se llevaron a sequedad, se tamizó empleando una malla de 2 mm (N° 10, marca ASTM), se cuarteó y se tomó una porción analítica de 12,5 g de suelo que se enriqueció con 14 mL de una solución de 2,4 mg/L de Carbofuran y se dejó secar. Posteriormente se agregó 25 mL de acetato de etilo como solvente extractor y se realizó agitación mecánica en rotatorio lineal VICKING durante 3 h. El extracto se concentró en un evaporador rotatorio BUCHI a 35°C, luego se resuspendió con 1 mL de metanol. El extracto metanólico se sometió a Extracción de

Fase Sólida (EFS) de relleno C-18, previa activación con acetonitrilo. El extracto limpio de acetonitrilo se llevó a sequedad nuevamente en el evaporador rotatorio y se resuspendió con 1 mL de metanol. Se inyectó 10 µL del extracto en el cromatógrafo líquido, (HPLC) empleando un detector de arreglo de diodo (205 nm), con una columna C18.

Los parámetros determinados fueron: Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC) instrumentales y Recuperación del Método (RM). La construcción de la curva de calibración se realizó empleando soluciones patrones de Carbofuran en metanol.

Los procedimientos de extracción y cuantificación se realizaron en los suelos enriquecidos a intervalos de 7 a 15 días, durante 45 días. Con las concentraciones determinadas se construyó una curva de degradación (concentración vs tiempo) del Carbofuran en el suelo enriquecido de Maimará. Cada punto de la curva se analizó por triplicado.

Se considera que la degradación del Carbofuran en relación al tiempo son congruentes con una cinética de primer orden, por lo tanto debe cumplir con la ley de rapidez de primer orden integrada que tiene una forma lineal, que corresponde con la ecuación $[CF]_t / [CF]_0 = e^{-kt}$, donde $[CF]_0$ es la cantidad de Carbofuran expresado en mg/kg en el suelo al tiempo cero, $[CF]_t$ es la cantidad de Carbofuran en el suelo en el tiempo t, k (día⁻¹) es la constante de velocidad y t el tiempo en días (Silambarasan y Jayanthi, 2013).

Aislamiento de *Trichoderma* autóctona: Las muestras de suelo se agitaron durante 30 minutos en agua destilada estéril y se prepararon diluciones seriadas. Alícuotas de 20 µL de las diluciones 1×10^{-2} y 1×10^{-3} se sembraron en Agar Cayote 3 % suplementado con ácido láctico al 10% con el objeto de inhibir el crecimiento de las bacterias (French y Hebert 1980). La purificación de la cepa de *Trichoderma* sp. se realizó en cajas de Petri con agar papa glucosa 2 % (APG 2 %) a 27 ± 1 °C durante 5 días. Transcurrido ese tiempo se procedió a caracterizar macroscópica, microscópica y molecularmente la cepa aislada.

Pruebas de tolerancia, viabilidad y germinación de los conidios en Carbofuran del microorganismo aislado y caracterizado: Las concentraciones de Carbofuran utilizadas fueron 35, 98, 177 y 315 mg/L preparadas en metanol y una solución de metanol.

El agregado del plaguicida en el APG 2% se realizó en condiciones asépticas, distribuyendo 100 µL de las diferentes soluciones sobre las superficies, con la ayuda de una espátula de Drigalski. Cada tratamiento con el agroquímico se trabajó por quintuplicado, se incluyó un Control Absoluto (CA) y un Control con Metanol (CM). Las cajas de Petri con CM se trataron con 100 µL de solución metanol.

La siembra se realizó colocando un disco de 0,5 cm de diámetro de la colonia fúngica, de 5 días de edad, en el centro de cada caja (9 cm de diámetro) impregnadas con 100 µL de las soluciones de Carbofuran. Se incubó a 27 ± 1 °C durante 5 días, registrándose cada 24 h el desarrollo miceliar (DM).

Para evaluar el efecto que tiene el plaguicida sobre la capacidad de producción de esporas (viabilidad), se preparó una suspensión de esporas provenientes del ensayo de tolerancia por el método de barrido de colonia, llevando a un volumen final de 10 mL con agua destilada estéril. Se mezcló en un vortex hasta obtener una solución homogénea, se prepararon soluciones seriadas 10^{-1} y 10^{-2} , se transfirieron 100 µL de cada solución a la cámara de Neubauer y se procedió al conteo, expresando el resultado en número conidios/mL.

Para evaluar el porcentaje de germinación se prepararon microcultivos en APG 2%, empleando las soluciones de 10^{-2} del ensayo de viabilidad para cada concentración, se sembraron 10 µL de estas suspensiones y se incubaron a 27 ± 1 °C durante 18 h.

El metanol se incluyó como un tratamiento más, debido a que se emplea como disolvente del Carbofuran y es necesario evaluar si afecta la esporulación y/o germinación de *Trichoderma*.

Análisis estadístico: El diseño estadístico empleado para los ensayos de tolerancia y viabilidad fue completamente al azar. Los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias (Duncan $\alpha = 0,05$) mediante el programa InfoStat Profesional versión 2019.

RESULTADOS

Relevamiento de datos: Las encuestas realizadas a 32 productores de la Quebrada de Humahuaca demostraron que el Carbofuran fue el plaguicida más utilizado, Figura 1.

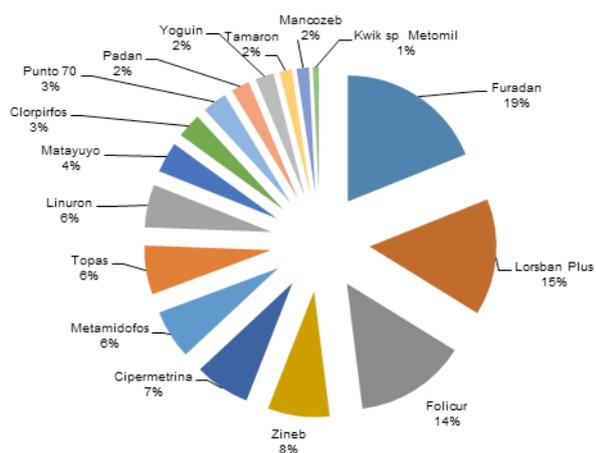


Figura 1. Plaguicidas empleados por productores de la Quebrada de Humahuaca

Recolección de suelos y análisis físico - químico: De las seis muestras de suelos recogidas de la localidad de Maimará, se seleccionó arbitrariamente la muestra ubicada a 23°38'21,5" S - 65°25'17,2" W, cuya caracterización físico-química se registran en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización físico - química del suelo

Textura	Franco Arenoso
Materia orgánica (g%)	1,10
pH en pasta saturada	7,72
Conductividad Eléctrica Específica (CEE) en extracto de saturación (mhos/cm a 25 °C)	3,70
Arena (g%)	60,20
Limo (Amer- g%)	20,80
Arcilla (g%)	19
Carbono orgánico (g%)	0,64
Nitrógeno total (g%)	0,08
Fósforo "extractable" (mg.kg ⁻¹)	6,27
Carbonato de Calcio (g%)	6,51

Método de cuantificación de Carbofuran en suelos enriquecidos: Para la técnica de cuantificación se determinó una RM del 103,75 %, LD = 0,05 mg/L y LC = 0,1 mg/L.

En el Tabla 2 se registra el punto 0 (inicio de la curva) correspondiente al día de aplicación del Carbofuran, con una concentración de 2,70 mg/kg suelo. A partir de este punto se determinaron las concentraciones de Carbofuran en suelo.

Tabla 2. Valores Residuales Promedios de Carbofuran

Días	Residuo mg/Kg suelo	DS (±)
0	2,7	0,289
14	1,92	0,213
31	1,48	0,304
38	1,10	0,182
45	0,97	0,000

En la Figura 2, se representa la curva de degradación del plaguicida, donde se observa la degradación del Carbofuran en función del tiempo con una constante de velocidad de 0,021 día⁻¹ transcurridos los 45 días, confirmando la cinética de primer orden.

El plaguicida se degrado en un 64 % transcurrido 45 días desde la aplicación. En las condiciones experimentales el tiempo de vida media del Carbofuran en el suelo de Maimará fue de 33 días.

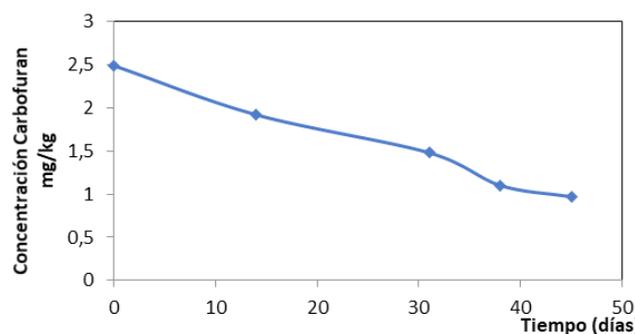


Figura 2. Curva de Degradación del Carbofuran en suelo de Maimará

Aislamiento de *Trichoderma*. Se aisló una cepa autóctona de *Trichoderma* sp. como se muestra en la Figura 3, de una parcela de la localidad de Hornillos (Maimará, Jujuy). La caracterización macroscópica se hizo considerando el aspecto de la colonia fúngica, la misma presentaban bordes regulares, de crecimiento rápido, 9 cm de diámetro después de 96 h de incubación a una temperatura de 27 ± 1 °C, inicialmente las colonias eran de color blanco, tornándose verdosas, hasta adquirir un color definitivo de verde oscuro. El reconocimiento de las características microscópicas se observaron cómo hifas con pocos septos, conidióforos erectos con ramificaciones a lado y lado de las hifas, estas ramificaciones presentaban forma de botella (fiálides), conidios pequeños globosos hiálinos. La identificación molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Eucariotas Inferiores - PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) y se obtuvo del aislamiento que la cepa en estudio tiene un 99% de Identidad con *Trichoderma asperellum* como así también con *Trichoderma viride*. Se confirmó que el género es *Trichoderma* sp. y a la misma se la identificó como T01.



Figura 3. *Trichoderma* sp. autóctona aislada de suelos Maimará – Jujuy

Pruebas de tolerancia, viabilidad y germinación de los conidios en Carbofuran

La Figura 4 muestra el comportamiento del DM de la cepa. En ausencia del insecticida (CA y CM) la cepa T01 cubrió la caja de Petri totalmente al quinto día. En presencia del insecticida a las concentraciones de trabajo el DM tuvo igual comportamiento que en ausencia del agroquímico.

También se puede observar en la Figura 4 que hubo un mayor crecimiento para la cepa expuesta a una concentración de 177 mg/L, pero no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) en el DM entre ésta, las demás concentraciones y el CA.

No se observa inhibición de la cepa frente a las concentraciones de trabajo y tampoco con el CM (Figura 5).

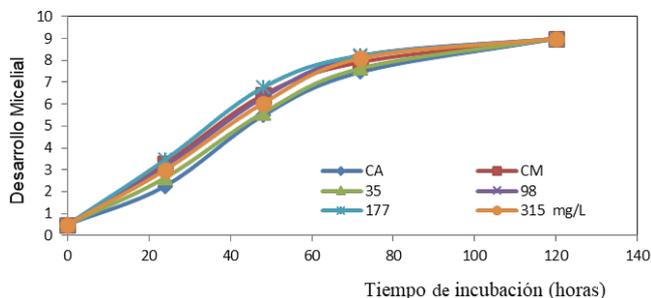


Figura 4. Dinámica de crecimiento Micelial de la cepa fúngica *Trichoderma* sp. (T01), en APG 2% expuesta a Carbofuran (mg/L)

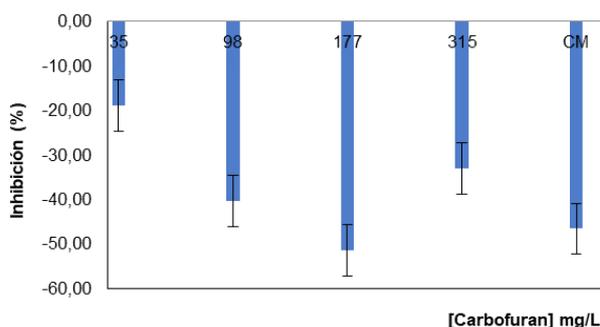


Figura 5. Porcentajes de Inhibición del desarrollo (PID) del hongo filamentoso expuesto a Carbofuran (mg/L). Valores negativos de PID indican mayor desarrollo micelial. Medias \pm error standard, n = 5

Con respecto a los porcentajes de inhibición de desarrollo (PID), la cepa de *Trichoderma* sp. presenta valores negativos esto indica un mejor desarrollo del DM en las concentraciones de trabajo y el mismo comportamiento se presenta para el CM.

En el Tabla 3, se detallan los resultados obtenidos del ensayo de esporulación in vitro de la T01. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre el CA y las diferentes concentraciones del agroquímico y CM. El tratamiento de exposición a 315 mg Carbofuran/L presentó una mayor esporulación.

Los porcentajes de germinación de los conidios que se muestra en la Tabla 3 estuvieron muy

próximos a 100 %.

Concentración mg Carbofuran/L en APG 2%	Recuento de conidios / mL a los 5 días	Porcentaje de germinación en 18 h
315	3,18. 10 ⁷	98%
177	2,59.10 ⁷	97%
98	2,78. 10 ⁷	98%
35	2,63. 10 ⁷	96%
CA	2,64. 10 ⁷	99%
CM	2,45. 10 ⁷	97%

Tabla 3. Recuento de conidios y Porcentaje de germinación

DISCUSION

En la Figura 1 se observa el amplio abanico de Plaguicidas utilizados en el sitio de esta investigación, entre los que se destacan insecticidas, fungicidas y herbicidas de diferentes familias químicas (organofosforados, carbámicos, cipermetrina). La frecuencia en el uso de estos productos químicos en el control de plagas y enfermedades se extiende a lo largo del país y de Latinoamérica (Castellanos González, Lorenzo Nicao & Lina Muiño, 2015; Blanco et al., 2013). Países con intensa actividad agrícola como Tailandia e India reportaron la presencia de plaguicidas en el suelo, agua y sedimento (Rama Krishna & Philip, 2008), datos científicos que coinciden con los relevados en Jujuy ratificando el uso indiscriminado de productos de síntesis química.

La caracterización físico químico de los suelos en esta investigación (Tabla 1) muestran valores similares a los descriptos por Zamora Gómez et al. (2013) para la región de la Quebrada de Jujuy. El aislamiento del microorganismo autóctono, se realizó en un suelo de pH neutro, con bajo contenido de Carbono orgánico, y el estudio de degradación del Carbofuran se realizó en estas condiciones. Pimmata et al. (2013) evaluaron la degradación del Carbofuran en suelos con cultivos de arroz, cuyos contenidos de carbono orgánico y nitrógeno

total son mayores a los del presente trabajo y de menor pH. Estos datos son de relevancia debido a que las características físico - química de los suelos determinan la estabilidad y la degradación de los plaguicidas, pudiendo influir también en la presencia y actividad de microorganismos autóctonos. Estudios realizados por Blanco y otros (2013) en los que consideraban la estabilidad del Carbofuran en suelo, mencionaron que altos contenidos de carbono orgánico incrementaron la persistencia de los carbamatos en el suelo, además que en suelos ácidos la degradación fue más lenta que en suelos alcalinos. Registraron que la vida media del Carbofuran en estas condiciones fue de 43 días y en esta investigación se concluyeron que en condiciones de bajo contenido de C orgánico y suelo neutro la vida media fue de 33 días. Estas investigaciones demostraron que las características físico química de los suelos fue determinante para la permanencia del Carbofuran en los suelos.

En el análisis del contenido de Carbofuran en los suelos se detectó residuos del toxico aún transcurridos 45 días. La Figura 2, muestra que la degradación del Carbofuran se ajusta al modelo cinético de primer orden, datos semejantes a los publicados por Plangklang & Reungsang (2009), investigadores que estudiaron la cinética de degradación del Carbofuran en reactores de lodos en diferentes condiciones, para seleccionar la más efectiva para el posterior uso en biorremediación. Resultados similares obtiene Pimmata et al. (2013) cuyo objetivo fue investigar diversas técnicas de biorremediación del carbofuran en suelos. Hace más de una década Trabue (1997) estudió la cinética de degradación del Carbofuran en diferentes suelos en Estados Unidos, algunos con historias de aplicación previas. Investigó diferentes métodos de cuantificación, así como la profundidad de la absorción del plaguicida en los suelos y en todos los casos confirmó el primer orden de la reacción de degradación. Diaz, Saavedra, Borkosky & Bovi Mitre (2007) y Kulczycki, Navarro, Turaglio, Becerra & Sosa (2012) investigaron la cinética de degradación de Pirimetanil, en un cultivo de frutillas y el Clorpirifos en cítricos, obteniendo datos semejantes con respecto al orden de reacción determinado en este trabajo.

El tiempo de degradación del Carbofuran determinado en esta investigación fue mayor al informado por Pimmata et al. (2013), considerándose que dicho proceso fue más lento en las condiciones del ensayo. En la presente investigación el tiempo de vida media calculado

fue el doble que el reportado por Pimmata ($t_{1/2}$ = 16,63 días), destacándose que se trabajó con una concentración inicial de Carbofuran menor a lo informado por el investigador en Tailandia.

Un factor que se indica como determinante para la permanencia de los plaguicidas en suelo es la temperatura ambiental. Aparicio, De Gerónimo, Hernández Guijarro, Pérez, Portocarrero & Vidal (2015) determinaron que a temperaturas menores de 15 °C el tiempo de vida media de la degradación del Carbofuran es aproximadamente cuatro veces mayor que a 35 °C. Es posible que la temperatura de Laboratorio fue menor a la experimentada en los campos de arroz y por ello se ve enlentecida la degradación del Carbofuran.

En la búsqueda de microorganismos autóctonos de los suelos de la Quebrada se aisló y caracterizó la cepa T01 de *Trichoderma* cuyo desarrollo se observa en la Figura 3. El suelo en el cual se aisló la T01 registra un pH ligeramente alcalino con bajo contenido de materia orgánica y alta salinidad, confirmando que este microorganismo es capaz de sobrevivir en condiciones extremas. Las características macroscópicas y microscópicas de la T01 son similares a las que obtuvo Sivila, Álvarez & Bonillo (2016) quienes aislaron *Trichoderma* sp., no sólo de la Región de la Quebrada sino también de la Puna de Jujuy.

En esta investigación, se observó crecimiento micelial tanto en el CA, CM y en los ensayos con diferentes concentraciones del agroquímico, según se observa claramente en la Figura 4. Por lo tanto, la T01 no presentó inhibición en el tiempo durante la experiencia (Figura 5), resultados coincidentes con los obtenidos por Yang y otros (2011) con la bacteria *Pichia anomala* HQ-C-01, microorganismo capaz de tolerar y degradar el Carbofuran. Resultados diferentes fueron obtenidos en la investigación que realizó Castellanos González et al. (2015) quienes trabajaron con *Trichoderma harzianum* e informaron inhibición en el crecimiento micelial cuando se expuso a los fungicidas Zineb, Mancozeb y Folpet a concentraciones iguales y mayores al presente trabajo. Similares resultados a Castellanos González et al. (2015) obtuvo Argumedo (2011) al exponer durante 96 h diferentes cepas de *Trichoderma* a petróleo crudo, naftaleno y fenantreno. Stamatiu Sánchez et al. (2015) informan que a las 72 h de exposición a Endosulfan se produce una inhibición en la mayoría de las cepas fúngicas evaluadas (*Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor circinelloides*, *Alternaria alternata* entre

otras) observando la recuperación de cepas de *Trichoderma* y *Mucor circinelloides* a los 18 días. Estos resultados muestran que, dependiendo de los microorganismos expuestos así como del tóxico evaluado, la tolerancia o inhibición no sigue una regla general y debe determinarse experimentalmente para cada par microorganismo vs plaguicida.

Los valores obtenidos para el recuento de conidios estuvieron entre 2.10^7 y 3.10^7 conidios/mL, resultados que no son coincidentes con lo informado por Castellano González et al. (2015), quienes mencionan y señalan que al aumentar la concentración de los plaguicidas disminuye el número de conidios y que éste depende del formulado del agroquímico.

Rivera Jerez (2004), expuso a la cepa *Trichoderma Harzianum* a seis concentraciones distintas del fungicida Mancozeb, obteniendo un porcentaje de germinación alrededor del 64 % con concentraciones menores o iguales a 4 mg/mL, mientras que en esta investigación los valores rondaron entre los 96 – 99 % de germinación (Tabla 3). Además, Reyes y otros (2012) informaron resultados semejantes a Rivera Jerez (2004), con un porcentaje en la germinación de *Trichoderma asperellum* aproximadamente del 50% en presencia del herbicida 2,4 D sal de amina. En consonancia con Castellano González et al. (2012) informaron que la cepa *Trichoderma asperellum* expuesta a fungicidas folpet (ftalimida), mancozeb (ditiocarbamato) y zineb (ditiocarbamato) utilizados en el cultivo de arroz a concentraciones diferentes entre 10 a 2000 mg/L, la inhibición depende del fungicida y de la concentración aplicada al cultivo.

CONCLUSIÓN

Los datos experimentales de la degradación del plaguicida Carbofuran en el suelo de Maimará en condiciones de laboratorio, estableció una permanencia mayor a 45 días con un tiempo de vida media de 33 días.

Al realizar los ensayos *in vitro* con el microorganismo autóctono aislado se concluye que no se observa inhibición en el crecimiento micelial cuando fue expuesto a diferentes concentraciones del Carbofuran. Se puede afirmar, que es tolerante al plaguicida en las condiciones ensayadas. La eficiencia esporulativa y el porcentaje de germinación tienen un normal desarrollo, similar

al que presenta el control. Del análisis integral de los resultados se puede concluir que es promisorio iniciar pruebas de biorremediación de suelos contaminados con Carbofuran con *Trichoderma* autóctona en la Quebrada de Humahuaca (Jujuy).

BIBLIOGRAFÍA

- Aparicio, V., De Gerónimo, E., Hernández Guijarro, K., Pérez, D., Portocarrero, R. & Vidal, C. (2015). Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. 1° Ed. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. pp 73
- Argumedo-Delira R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. & Peña-Cabriales, J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 25 (4), 257 – 269.
- Argumedo-Delira, R. (2011). Respuestas fisiológicas de miembros del género *Trichoderma* a hidrocarburos poliaromáticos. Tesis doctoral. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. pp 227.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto J. C. & García-Río L. (2007). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123, 247-260. Doi:10.1016/j.agee.2007.07.011.
- Blanco, L., Marquina, M. E. & Castro, Y. (2013). Respuestas a la aplicación de carbamatos en dos aislados rizobianos provenientes de mucuchíes, estado Mérida, Venezuela. *Bioagro.* 25 (2), 117-128.
- CASAFE. (2015). Carbofuran. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes *Guía de Productos Fitosanitarios*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. pp 1200.
- Castellanos González, L., Lorenzo Nicao, M. & Lina Muiño, B. (2015). Efecto in vitro de plaguicidas comerciales sobre *Trichoderma harzianum* cepa A-34. *Rev. FCA UNCUYO.* 47(2), 185-196.
- Dhanasekara, S. A. K. M., Attanayake, A. N. B., Herath, A. C., Nanayakkara, N., Senarathne, A., Indrathne, S. P. & Weerasooriya, R. (2015). Partial degradation of carbofuran by natural pyrite. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management.* 4, 51–57. DOI: 10.1016/j.enmm.2015.07.002.
- Díaz, B., Saavedra, O. N., Borkosky, S. & Bovi Mitre M. G. (2007). Degradación de Residuos de Pirimetanil en Frutilla (*Fragaria x Ananassa* Duch). *Información Tecnológica.* 18 (2), 40 – 52.
- Fang, H., Xiang, Y. Q., Hao, Y. J., Chu, X. Q., Pan, X. D., Yu, J. Q. & Yu, Y. L. (2008). Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *Int. Biodeter. Biodegr.* 61, 294 – 303. DOI: 10.1016/j.ibiod.2007.10.001
- French, E. & Hebert, T. (1980). Medios de Cultivo. En: *Métodos de Investigación Fitopatológica*. (M. de la Cruz, Ed.). Editorial IICA. San José, Costa Rica. 33 - 46.
- IRAM (1999). IRAM – 29481-1. Calidad ambiental, Calidad del suelo, Muestreo. Parte 1: Directivas para el diseño de programas de muestreo. Instituto Argentino de Normalización y Certificación. IRAM CASA CENTRAL. 22 de septiembre 1999.
- Khalid, S., Hashmi, I. & Khan, S. J. (2015). Bacterial assisted degradation of chlorpyrifos: The key role of environmental conditions, environmental conditions, trace metals and organic solvents. *Journal of Environmental Management.* 168, 1 – 9. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.11.030
- Kulczycki, C., Navarro, R., Turaglio, E., Becerra, V. & Sosa, A. (2012). Cinética de degradación y persistencia de clorpirifos en mandarinas y naranjas del Noreste argentino (NEA). *RIA.* 38 (3), 283 – 286.
- Plangklang, P. & Reungsang, A. (2009). Bioaugmentation of carbofuran by *Burkholderia cepacia* PCL3 in a bioslurry phase sequencing batch reactor. *Process Biochemistry.* 45, 230 – 238. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.09.013
- Pimmata, P., Reungsang, A. & Plangklang, P. (2013). Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85, 196 – 204. DOI: 10.1016/j.

ibiod.2013.07.009.

- Rama Krishna, K. & Philip, L. (2008). Biodegradation of lindane, methyl parathion and carbofuran by various enriched bacterial isolates. *Journal of Environmental Science and Health. Part B.* 43, 157 - 171
- RAP-AL. (2008). Plaguicida con Prontuario. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina. Consultado en marzo de 2018. [en línea] <http://studyres.es/doc/3158666/carbofurano---rap-al>.
- Reyes, Y., Infante, D., García Borrego, J., Del Pozo, E., Cruz, A. & Martínez, B. (2012). Compatibilidad de *Trichoderma asperellum* Samuels con herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz. *Revista Protección Vegetal.* 27(1), 45 - 53.
- Rivera Jerez, C. G. (2004). Evaluación de sensibilidad in vitro de Trichozam® (*Trichoderma harzianum*) a nueve fungicidas. Tesina de Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Zamorano. Honduras. pp 43.
- Romero, A. E., Tschambler, J. A., Saavedra, N., De Pascuale, J. & Bovi Mitre, M. G. (2012). Curva de degradación del plaguicida Furadan en suelos de Maimará - Quebrada de Humahuaca-Jujuy-Argentina. Memorias. XXIX Congreso Argentino de Química, Mar del Plata, Buenos Aires, 3 al 5 de octubre, 2012. CD - ROM.
- Silambarasan, S. & Jayanthi, A. (2013). Ecofriendly Method for Bioremediation of Chlorpyrifos from Agricultural Soil by Novel Fungus *Aspergillus terreus* JAS1. *Water Air Soil Pollut.* 224(1369), 1-11. DOI 10.1007/s11270-012-1369-0.
- Sivila, N. F., Alvarez, S. E. & Bonillo, M. C. (2016) Aislamiento y selección de cepas nativas de *Trichoderma* sp. provenientes de suelos de Jujuy, como alternativa para el manejo de enfermedades fúngicas. Memorias. XI Jornadas de Ciencia y Tecnología de Facultades de Ingeniería del NOA, San Salvador de Jujuy, Jujuy 23 y 24 de Junio, 2016. CD ROM.
- Stamatiu-Sanchez, K., Alarcon, A., Ferrera - Cerrato, R., Nava Díaz, C., Sanchez Escudero, J., Cruz Sanchez, J. S. & Castillo, M. P. (2015). Tolerancia de hongos filamentosos a Endosulfan, Clorpirifos y Clorotalonil en condiciones in vitro. *Rev. Int. Contam Ambie.* 31(1), 23-37.
- Tejomayee, S., Bhalerao, P. & Puranik, R. (2007) Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 59, 315-321. DOI: 10.1016/j.ibiod.2006.09.002
- Trabue, S. L. (1997). Enhanced biodegradation of carbofuran in soil with a history of repeated applications of carbofuran and characterization of bacterial degraders isolated from the soil. Tesis Doctoral. Universidad de la Florida. Florida, Estados Unidos. pp 167
- Valencia, Y., Potosí, S., Valencia, E. & Bravo I. (2010). Validación de una Metodología para la Determinación en suelos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detección Ultravioleta (CLAR - UV). *Rev. Colomb. Quím.* 39, 359 - 370.
- Wierna, N., Ruggeri, A., Escalera, A., Tschambler J. A. & Bovi Mitre M. G. (2016). Determinación de residuos de Carbofuran en apios cultivados en la región de la Quebrada de Humahuaca, provincia de Jujuy. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Agrarias.* IX (16), 86 - 92
- Yang, L., Chen, S., Hu, M., Hao, W., Geng, P. & Zhang, Y. (2011). Biodegradation of carbofuran by *Pichia anomala* strain HQ-C-01 and its application for bioremediation of contaminated soils. *Bio Fertil Soils.* 47, 917 - 923. DOI: 10.1007/s00374-011-0602-0.
- Zamora Gómez, J. P., Abdo, G. C., Achem, M. V., Mamaní, P. G., Quispe, J. E. S., De Brito, L. A., Hermida, M. S., Torrejon, N. D., Binder, G. E. & Józse, I. 2013. Conociendo Maimará. En: Experiencia del voluntariado universitario en el distrito de Riego de Maimara, Quebrada de Humahuaca - Provincia de Jujuy. (V. Achem, Ed.). Ediciones INTA. Buenos Aires, pp. 28 - 29.

