

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
BIOLOGÍA**



**Identificación de bacterias degradadoras de
p-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de
Erythroxylum coca "coca" del Centro Poblado de
Mayapo Provincia de Huanta Ayacucho-2012**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA**

PRESENTADO POR

Bach. OSEJO PACHECO, ROCÍO DEL PILAR

AYACUCHO-PERÚ

2013

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R. D. N. 251-2013-FCB-D

Bach. ROCÍO DEL PILAR OSEJO PACHECO.

En la ciudad de Ayacucho, a los diecinueve días del mes de diciembre del año dos mil trece, siendo las cuatro y trece minutos de la tarde, reunidos en el Paraninfo de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, bajo la presidencia del Decano Dr. Tomas Castro Carranza y actuando como miembros del jurado calificador, los señores docentes: Blga. Nery Santillana Villanueva, Dr. Saúl Chuchón Martínez quien además es el asesor de la tesis y el Dr. Edwin Carlos Enciso Roca y actuando como secretaria docente la Blga. Rosa Cortez Saavedra. A mérito a la R.D.N° 251-2013-UNSCH-D de fecha 10 de diciembre del 2013. La referida comisión se reunió con la finalidad de recepcionar la sustentación de la tesis con fines de titulación, denominada: **Identificación de bacterias degradadoras de p-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo Provincia de Huanta, Ayacucho – 2012**, presentada por la Bachiller en Ciencias Biológicas Srta. Rocío Del Pilar Osejo Pacheco quien pretende optar el título profesional de Bióloga, con mención en la especialidad de Microbiología.

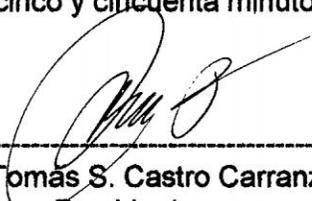
Luego de verificar la documentación correspondiente el Sr. Decano en su calidad de presidente de la comisión evaluadora invita la Srta. sustentante a iniciar con la sustentación y defensa de su trabajo de investigación en un tiempo estimado de cuarenta y cinco minutos de acuerdo al reglamento.

La señorita sustentante inició su exposición expresando su agradecimiento a todos quienes contribuyeron en su Formación Profesional y el desarrollo de la investigación, inmediatamente inició la exposición de su trabajo de investigación. Concluida la etapa de exposición el Sr. Presidente del jurado evaluador invitó a los miembros del jurado a solicitar las aclaraciones, preguntas u observaciones que crean por conveniente. Concluida la etapa, el Sr. Presidente del Jurado evaluador invitó a la señorita sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente las instalaciones del Paraninfo Universitario (UNSCH), para que los miembros del Jurado Calificador puedan deliberar y calificar el trabajo de investigación, arribándose a los siguientes resultados:

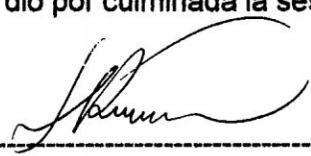
Miembros del Jurado	Exposición	Rpta. a preguntas	Promedio
Dr. Tomás Castro Carranza.	16	15	16
Mg. Serapio Romero Gavilán.	16	16	16
Blga. Nery Santillana Villanueva.	15	14	15
Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez.	18	16	17
Dr. Edwin Enciso Roca.	17	17	17
		Promedio	16

Luego de concluida la etapa de calificación la sustentante ha obtenido la calificación promedio aprobatorio de DIECISEIS (16), de la cual dan fe, los miembros del Jurado calificador, estampando sus firmas al pie de la presente acta.

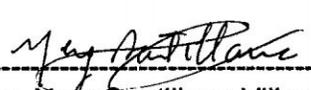
Siendo las cinco y cincuenta minutos de la tarde se dió por culminada la sesión.



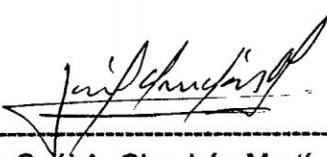
Dr. Tomás S. Castro Carranza
 Presidente



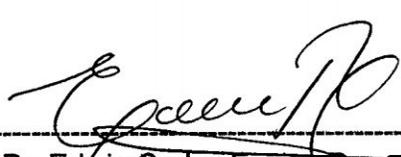
Mg. Serapio Romero Gavilán
 Miembro



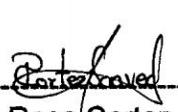
Blga. Nery Santillana Villanueva
 Miembro



Dr. Saúl A. Chuchón Martínez
 Miembro – Asesor



Dr. Edwin Carlos Enciso Roca
 Miembro



Blga. Rosa Cortez Saavedra
 Secretaria Docente

A Dios todo poderoso.

*Al ser más dulce y maravilloso, mi
madre.*

A Zahid y Jazmín.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga *alma mater*, fuente de sabiduría y forjadora de anhelos y sueños quien me brindó su techo durante mi formación profesional.

A los Docentes del Departamento Académico de Ciencias Biológicas quienes me brindaron los conocimientos y enseñanzas durante mi formación profesional.

Al Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez, por brindarme los conocimientos y despertar inquietudes en la investigación de la microbiología ambiental, por su asesoramiento y dedicación en la ejecución del presente trabajo de tesis.

A cada una de las personas que me brindaron su apoyo en alguna de las etapas de la ejecución del presente trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	6
2.2.1. El suelo	6
2.2.2. Contaminación del suelo por pesticidas	7
2.2.3. Mecanismos que influyen en la evolución de pesticidas en el suelo	9
2.2.4. Metabolitos de compuestos organofosforados	12
2.2.5. Nitrofenol	15
2.2.6. El p-nitrofenol como fuente contaminante del medio ambiente	16
2.2.8. Degradación del p-nitrofenol	22
2.2.9. Géneros de bacterias degradadoras de p-nitrofenol	22
2.2.10 Características de géneros de bacterias degradadoras de p-nitrofenol	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Localización de la zona de estudio	26
3.2. Muestra y sistema de muestreo	27
3.3. Métodos para la recolección de datos	27
3.4. Análisis de datos	30
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN	42
VI. CONCLUSIONES	50
VII. RECOMENDACIONES	51
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características de los plaguicidas.	09
Tabla 2. Persistencia del pesticida en el suelo.	11
Tabla 3. Nivel de Toxicidad del <i>p</i> -nitrofenol.	18
Tabla 4. Biodegradación del <i>p</i> -nitrofenol.	19
Tabla 5. Biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol en relación a DBO ₅ /TOC.	19
Tabla 6. Principales indicadores de plaguicidas.	21
Tabla 7. Características culturales de cepas bacterianas degradadoras de <i>p</i> -nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho 2012.	38
Tabla 8. Resultados de pruebas bioquímicas de identificación de bacterias degradadoras de <i>p</i> -nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho 2012.	39
Tabla 9. Géneros de bacterias degradadoras de <i>p</i> -nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho 2012.	40
Tabla 10. Porcentaje de los géneros de bacterias degradadoras de <i>p</i> -nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho 2012.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Esquema de mecanismos que influyen en la evolución de Plaguicidas.	10
Figura 2. Fórmula global del paratión.	12
Figura 3. Fórmula global del metil paratión.	13
Figura 4. Biotransformación del metil paratión.	14
Figura 5. Síntesis del <i>p</i> -nitrofenol.	15
Figura 6 Lista de fenoles contaminantes prioritarios.	17
Figura 7. Biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 4 mg/L según horas transcurridas.	31
Figura 8. Biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 7 mg/L según horas transcurridas.	32
Figura 9. Biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 10 mg/L según horas transcurridas.	33
Figura 10. Biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 12 mg/L según horas transcurridas.	34
Figura 11. Porcentaje de biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho 2012.	35
Figura 12. Cantidad total de <i>p</i> -nitrofenol degradado por consorcio microbiano en relación a diferentes tratamientos.	36
Figura 13. Biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol por cepas individuales aislados de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho 2012.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Densidad de los cultivos de coca en el VRAEM (Mapa topográfico).	57
Anexo 2. Mapa de la localidad del Centro Poblado de Mayapo.	58
Anexo 3. Obtención de muestras de suelos de cultivo de coca.	59
Anexo 4. Crecimiento de las colonias sobre agar Busnell Hass 1.	60
Anexo 5. Crecimiento de las colonias sobre agar Busnell Hass 2.	61
Anexo 6. Crecimiento de las colonias sobre agar Busnell Hass 3.	62
Anexo 7. Conservación de cepas.	63
Anexo 8. Frascoscultivados conteniendo medio mineral Busnell Hass.	64
Anexo 9. Curva patrón para medir la concentración <i>p</i> -nitrofenol.	65
Anexo 10. Valores de la absorbancia de <i>p</i> -nitrofenol.	66
Anexo 11. Valores de la concentraciones <i>p</i> -nitrofenol.	67
Anexo 12. Valores de la absorbancia <i>p</i> -nitrofenol obtenidas de la biodegradación realizado por cepas.	68
Anexo 13. Valores de la concentraciones <i>p</i> -nitrofenol obtenidas de la biodegradación realizado por cepas.	69
Anexo 14. Análisis de varianza concentración de 4mg/L de <i>p</i> -nitrofenol	70
Anexo 15. Análisis de varianza de efectos principales para la biodegradación <i>p</i> -nitrofenol (mg/L) comparando un blanco y 3 consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" en 48 horas, a una concentración inicial de 7 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol.	71
Anexo 16. Análisis de varianza concentración de 10 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol	72
Anexo 17. Test de Tukey para comparar la biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol (mg/L) en un blanco y tres consorcios bacterianos a una concentración inicial de 10 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol.	73
Anexo 18 Análisis de varianza de efectos principales para la biodegradación <i>p</i> -nitrofenol (mg/L) comparando un blanco y 3 consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de <i>Erithroxylum coca</i> "coca" en 72 horas a una concentración inicial de 12 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol.	74
Anexo 19 Test de Tukey para comparar la biodegradación de <i>p</i> -nitrofenol (mg/L) en un blanco y tres consorcios bacterianos a una concentración inicial de 12 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol.	75
Anexo 20. Crecimiento de las colonias amarillas sobre agar sangre	76
Anexo 21. Crecimiento de las colonias sobre agar MacConkey	77
Anexo 22. Pruebas bioquímicas de TSI, LIA, MIO, Urea	78
Anexo 23. Medio MIO con resultado positivo y reactivo de Kovacs	79
Anexo 24. Matriz de consistencia	80

RESUMEN

En la actualidad el aumento del uso de pesticidas en la actividad agrícola ha generado la acumulación de grandes cantidades de compuestos tóxicos, uno de estos es el *p*-nitrofenol, cuya concentración se incrementa como consecuencia directa del uso de pesticidas en la agricultura. La presente investigación tiene como objetivo general identificar los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo, provincia de Huanta - Ayacucho. La investigación es de tipo básica, nivel descriptivo, diseño transversal. El estudio se realizó con tres unidades de muestra tomadas de tres terrenos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo por un método no probabilístico. A partir de tales muestras se procedió al aislamiento de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol utilizando el medio mineral Busnell Hass suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol, las colonias fueron purificadas en agar nutritivo y conservadas como cepario. A partir de estas se obtuvieron 3 consorcios, con las cepas aisladas de cada terreno. La evaluación de la capacidad biodegradadora del *p*-nitrofenol se realizó con tratamientos de 4, 7, 10, 12 mg/L por un periodo de 72 horas. La concentración de *p*-nitrofenol y determinación del mismo, se realizó utilizando el espectrofotómetro "espectrofotometer 1200" serie ÚNICO haciendo lecturas a 380 nm de longitud de onda. La identificación de las cepas bacterianas se realizó mediante las pruebas bioquímicas: oxidasa, TSI, LIA, motilidad y urea. A partir de una concentración 4 mg/L de *p*-nitrofenol los tres consorcios microbianos lograron degradar el 99% en 24 horas; A partir de una concentración 7 mg/L de *p*-nitrofenol los tres consorcios microbianos lograron degradar el 99% en 48 horas; A partir de las concentraciones 10 mg/L y 12 mg/L de *p*-nitrofenol los tres consorcios microbianos lograron degradar hasta un 98 % en 72 horas. Las cepas aisladas con capacidad degradadora de *p*-nitrofenol pertenecen a los géneros *Sphingomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.* El consorcio microbiano C3 (*Sphingomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.*) tuvo la mejor capacidad degradadora de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 10 y 12 mg/L la cual ha sido comprobada por análisis de varianza ($\alpha < 0,05$) y la prueba de tukey.

Palabras clave: degradación, *p*-nitrofenol, insecticidas, *Erythroxylum coca*.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el aumento del uso de pesticidas en la actividad agrícola ha generado grandes cantidades de compuestos tóxicos. Estos compuestos han sido liberados al ambiente causando una extensa contaminación de suelos y cuerpos de agua¹. Uno de estos compuestos tóxicos puede ser el *p*-nitrofenol, cuya concentración se incrementa como consecuencia directa del uso de pesticidas en la agricultura. El *p*-nitrofenol puede acumularse en el suelo como resultado de la hidrólisis de varios insecticidas organofosforados y herbicidas nitrofenólicos, además puede entrar al ambiente durante la elaboración de tintes, pesticidas y medicamentos².

El problema fundamental por el cual pasa el Centro Poblado de Mayapo, jurisdicción del Distrito de LLochegua ubicada en la Provincia de Huanta, Departamento de Ayacucho es la contaminación de suelos por el uso frecuente de pesticidas y fertilizantes que utilizan los pobladores.

Con el fin de incrementar y mejorar la producción de la hoja de coca se ha venido masificando el uso de agroquímicos para estos cultivos. La falta de conocimiento de los productores cocaleros, que no miden las consecuencias ambientales al usar grandes cantidades de productos agroquímicos, al ser utilizados persiste en un tiempo y compuestos tóxicos como el *p*-nitrofenol pueden acumularse en el suelo agrícola. Por factores climáticos, estos

compuestos discurren a los cursos de agua, afectando la biodiversidad y a la población por consumir el agua y los alimentos, ocasionando enfermedades y mortandad por acumulación de toxinas³.

Debido a la alta toxicidad de este compuesto, una alternativa atractiva para disminuir la concentración de *p*-nitrofenol es la biodegradación, motivo por el cual se realiza el presente trabajo de investigación de tipo básica, nivel descriptivo, diseño transversal en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga con los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Identificar los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erithroxyllum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo, provincia de Huanta. Ayacucho.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los géneros de las bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erithroxyllum coca* "coca".
- Medir la capacidad degradadora de *p*-nitrofenol por parte de bacterias aisladas de suelos de cultivo de *Erithroxyllum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo, Provincia de Huanta. Ayacucho.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Antecedentes Nacionales

En el año 2009, Chavez, en el Instituto de Ecología, México, efectuó una investigación del “Efecto de metil paratión en la diversidad bacteriana presente en el suelo agrícola” con la finalidad de estudiar el comportamiento de este plaguicida en el suelo, su efecto de emisión de CO₂ y mineralización del nitrógeno, cuyos resultados fueron respecto a la remoción del metil paratión éste siguió una cinética de primer orden con una vida media de 16 y 34 días, la mineralización de *p*-nitrofenol se detectó después de los tres días y las bacterias identificadas: *Acrhomobacter xyloxdan*, *Brevundimonas diminuta* y *Ochrobactrum lupini*⁴.

En el año 2007, Bracho, en la Universidad de Puerto Rico, realizó una investigación en aguas contaminadas con *p*-nitrofenol y evaluó la degradación de *p*-nitrofenol por bacterias aisladas de los ríos Añasco, Guanajibo y la Quebrada de Oro (Puerto Rico); la degradación del *p*-nitrofenol fue superior al 90%. El análisis de las secuencias de 16s del ADNr de las bacterias degradadoras aisladas mostró una estrecha similitud con el género *Pseudomonas sp.* género caracterizado por ser metabólicamente diverso y ha

sido ampliamente aislado de ambientes expuestos a una variedad de químicos tóxicos⁵.

En el año 2006, Gemini y colaboradores, a partir de sedimentos de un río contaminado de Buenos Aires, seleccionaron una cepa bacteriana autóctona de *Rhodococcus wratislaviensis* capaz de utilizar *p*-nitrofenol (PNP) como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. La cepa bacteriana seleccionada degrada *p*-nitrofenol en 34 y 56 horas, respectivamente y libera el grupo nitro del compuesto como nitrito. Dado que el nitrito liberado durante la degradación aeróbica de *p*-nitrofenol es también un compuesto tóxico ambiental el mismo fue removido acoplado un proceso anóxico de denitrificación. La detoxificación fue evaluada mediante la realización de ensayos empleando *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Vibrio fischeri* de acuerdo a las normas ISO 6341 (E) (1996); ISO 8692 (2004) e ISO 11348-3 (1998) respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que no se detectó toxicidad luego de la combinación de ambos procesos, biodegradación aeróbica y denitrificación en un proceso anóxico⁶.

En el año 2005, Castrejon y colaboradores, en la Facultad de Ciencias Biológicas y el laboratorio de investigaciones ambientales de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (México), efectuaron una investigación denominada caracterización e identificación de consorcio bacteriano capaces de crecer sobre plaguicidas organofosforados, determinándose de 11 bacterias, seis tenían la capacidad de crecer en presencia de paration metílico y cinco para cadusafos. Las especies identificadas son: *Bacillus brevis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Weeksella virosa*, *Flavobacterium odoratum*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*. Diferentes bacterias identificadas son patógenas, sin embargo pueden ser

utilizadas en el tratamiento de residuos de paratión metílico y cadusafos y probablemente, de otros plaguicidas de la misma familia química⁷.

En el año 2009, Ahumada y colaboradores, en la Universidad Javierana Colombia, realizaron una investigación donde se evaluaron la capacidad degradadora de fenol por bacterias, por medio de la respirometría como un método de la degradación. Se emplearon 57 cepas previamente investigadas en la línea de la biorremediación, encontrándose 11 bacterias con la capacidad para degradar el fenol. Los géneros que presentaron una degradación más eficiente fueron *Stenotrophomonas sp.* y *Acinetobacter sp.*⁸.

Antecedentes Nacionales

En el año 2010, Mezarina y colaboradores, realizaron el aislamiento de 5 especies bacterianas y sus parámetros biorremediadores sobre lixiviados del relleno sanitario de Paccha, Huancayo. Evaluando cuales de los parámetros: tamaño de inóculo, tiempo de retención y tipo de biorreactor, influyen sobre la actividad biorremediadora. Los microorganismos que se aislaron e identificaron fueron *Zooglea ramigera*, *Alcaligenes sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Beggiatoa sp.* Se determinó que todos los parámetros influyen decisivamente sobre la actividad biorremediadora de las especies microbianas empleadas⁹.

En el año 2010, en la Universidad Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas realizaron una investigación con el objetivo de evaluar la capacidad biodegradativa del ión tiocianato presente en efluentes mineros empleando bacterias aisladas de agua tratadas. Se identificaron molecularmente como *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Aeromonas punctata*. Se comprobó que las bacterias nativas poseen elevadas capacidades degradativas del ión tiocianato¹⁰.

En el año 2002, Gamboa, en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias Biológicas realizó el aislamiento e

identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos Los géneros identificados de bacterias degradadoras de hidrocarburos fueron cuatro: *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Aeromonas sp.* y las *Pseudomonas sp.* también se encontraron cepas sin lograr identificarlos¹¹.

En el año 2012, Chuchón, en la Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga Facultad de Ciencias Biológicas realizó la determinación de biodegradación de carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas de Chiara, los géneros conformados: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Artrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* y dos cepas no identificadas¹².

2.2. Marco conceptual

2.2.1. El suelo

El término suelo se refiere al material exterior, poco compacto de la superficie terrestre, un estrato característicamente diferente del lecho rocoso subyacente; está formado por cinco componentes principales: materia mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. Como regla general, el perfil del suelo está formado por tres principales capas: los horizontes A, B y C. Un perfil característico puede contener: a) una zona superficial delgada o gruesa de restos orgánicos en descomposición; b) un horizonte inferior del cual se han eliminado algunos constituyentes inorgánicos durante el largo periodo de formación del suelo; c) un horizonte a mayor profundidad en el cual se depositan algunos constituyentes de capas superiores, y d) un estrato de fondo, de composición semejante a la del material original a partir del cual se formó el suelo. El estrato de residuos orgánicos es el horizonte O. El horizonte A es el suelo superficial y corresponde al estrato que está sujeto a una marcada lixiviación; es también la capa de mayor interés desde el punto de vista

biológico, ya que en ella se encuentran en mayor densidad las raíces animales pequeños y microorganismos. El horizonte B, subsuelo subyacente al horizonte A, por lo general contiene poca materia orgánica, unas cuantas raíces y una escasa microflora. En la base del perfil se encuentra el horizonte C, capa que contiene el material parental del suelo. En este estrato la materia orgánica está presente en cantidades muy pequeñas y se observan pocas formas de vida¹³.

2.2.2. Contaminación del suelo por pesticidas

La contaminación de suelos por acción de residuos agroquímicos (pesticidas) se desarrolla normalmente en la agricultura¹⁴.

En la década de 1950 los pesticidas químicos fueron lanzados a nivel internacional como un milagro de la ciencia para enfrentar a los problemas de las plagas. Sin embargo, el uso cotidiano de esos químicos contribuye a la crisis de la agricultura que dificulta la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores urbanos¹⁵.

Las tasas de aplicación al suelo de ciertos pesticidas, tales como algunos fungicidas, son muy altas por lo que la microflora del suelo está expuesta a niveles que pueden afectar seriamente poblaciones individuales. Por otro lado, la potencia varía con la sustancia del tal modo que el impacto de la concentración del agente tóxico puede, algunas veces ser más grande que el impacto de un segundo agente tóxico presente en el suelo en nivel más alto. Por lo tanto la influencia de las sustancias en la comunidad o en las poblaciones que la constituyen está determinada por el pesticida particular, la concentración y la persistencia¹³.

2.2.2.1 Pesticida

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO; define pesticida como cualquier sustancia o mezclas de sustancias

destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos¹⁶.

Los pesticidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos:

a) Según su actividad biológica pueden clasificarse en insecticida, acaricida, fungicidas, desinfectante y bactericida, herbicida, fitorregulador, rodenticida y varios¹⁷.

b) Según el estado de presentación o sistema utilizado en la aplicación se clasifican en gases o gases licuados, fumigantes y aerosoles, polvos con diámetro de partícula inferior a 50 μm , sólidos, excepto los cebos y los preparados en forma de tabletas, líquidos, cebos y tabletas.

c) Según su grado de peligrosidad para las personas, los plaguicidas se clasifican de la siguiente forma:

- **De baja peligrosidad:** los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables.
- **Tóxicos:** los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos de gravedad limitada.
- **Nocivos:** los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte. **Muy tóxicos:** los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.

d) Según su estructura química: se los agrupa en organofosforados, organoclorados, carbamatos, compuestos inorgánicos, piretroides, derivados de la úrea, arsenicales, bipirilos, nitrofenólicos y muchos otros¹⁷.

Tabla 1. Características de los plaguicidas¹⁷.

Plaguicida	Características	Ejemplo
Organoclorados	Son muy estables en los diferentes ecosistemas, poca biodegradabilidad quizá debido a que el átomo de cloro sustituyente en la molécula es relativamente no reactivo; solubles en lípidos; se acumula en tejidos grasos de los animales; son transferidos através de la cadena alimenticia tóxicos en gran variedad de animales	DDT Aldrin Lindano Clordan
Organofosforados	Son ésteres fosforados y se hidrolizan con el agua; se infiltran hasta alcanzar las aguas subterráneas; menos persistentes que los organoclorados, plaguicidas de alta toxicidad aguda, por ser inhibidores permanentes de la colinesterasa sanguínea	Paratión Malatión Diazinon Diclorvos
Carbamato	Químicamente estos plaguicidas son derivados del ácido carbámico; estos compuestos se hidrolizan en el enlace carbamato degradándose rápidamente; son altamente tóxicos para los vertebrados	Carbaril Maneb Carbofuran
Bipirilo	Alta toxicidad por tratarse de una sal de amonio cuaternario, bloquea fotosíntesis de las plantas, y es degradado rápidamente por la Luz U.V.	Paraquat Diquat
Piretroide	Acción similar a las piretrinas naturales obtenidas del pelitre; acción insecticida; Actualmente se ha conseguido que sean de un tiempo más activo y mucho más estables en el curso de la exposición a la luz y al aire; son de alta toxicidad acuícola.	Permetrin Decametrin Fenvalerato
Dinitrofenólicos	Acción insecticida, herbicida; compuestos solubles en agua y en líquido y disolventes orgánicos; a largo plazo produce intoxicaciones crónicas; las manchas amarillas en la piel son los principales indicios exposición.	Dinitrocresol Binapacril Dinoseb

2.2.3. Mecanismos que influyen en la evolución de plaguicidas en el suelo.

- a) **Descomposición química**, que tiene lugar por procesos de oxidación, reducción, hidroxilación, dealquilación, rotura de anillos, hidrólisis e hidratación¹⁸.
- b) **Descomposición fotoquímica**, que se produce por efecto del espectro de luz ultravioleta de la luz solar. Las fuentes de luz y su intensidad regulan el grado de descomposición de un compuesto.

- c) **Descomposición microbiana**, la acción de los microorganismos del suelo sobre los plaguicidas es probablemente el mecanismo de descomposición más importante los microorganismos del suelo, bacterias, algas y hongos, obtienen alimento y energía para su crecimiento por descomposición de estos compuestos orgánicos sobre todo cuando carecen de otras fuentes.
- d) **Volatilización** o pérdida del compuesto en forma de vapor. Todas las sustancias orgánicas son volátiles en algún grado dependiendo de su presión de vapor, del estado físico en que se encuentren y de la temperatura ambiente.
- e) **Movimiento**, el transporte de un plaguicida en el suelo, por disolución o arrastre mecánico, se hace bajo la influencia del agua, bien de las precipitaciones atmosféricas que favorecen el movimiento de convección, bien de la imbibición que permite un desplazamiento por difusión molecular.
- f) **Descomposición por las plantas y organismos** como consecuencia de los procesos metabólicos que tienen lugar en las plantas¹⁸.

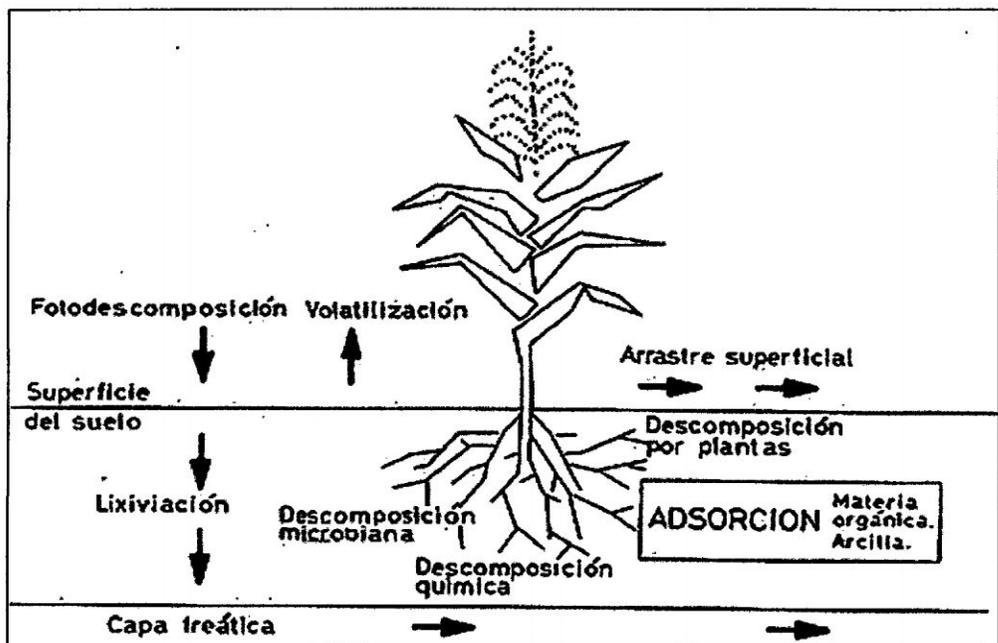


Figura 1. Esquema de los mecanismos que influyen en la evolución de plaguicidas en el suelo¹⁸.

2.2.3.1 Persistencia del pesticida en el suelo

Persistencia es la resistencia del pesticida a degradarse o descomponerse por parte de la acción de los microorganismos, acción química del suelo y de la luz solar. Los pesticidas persistentes permanecen más tiempo en el suelo, por lo que aumenta la probabilidad de que el pesticida sea arrastrado por el agua de riego o agua de lluvia hacia el agua subterránea¹⁴.

Tabla 2. Persistencia de pesticidas en el suelo¹⁶.

Clase	Acción	Persistencia	Proceso de degradación
Organoclorados	Insecticidas	2-5 años	Deshidrohalogenación o epoxidación
Úrea	Herbicidas	4-10 meses	Deshalquilación
Ácidos benzoicos	Herbicidas	3-12 meses	Deshalogenación
Amidas	Herbicidas	2-10 meses	Desalquilación
Carbamatos	Herbicidas Fungicidas Insecticidas	2-8 semanas	Hidrolisis de ésteres
Ácidos alifáticos	Herbicidas	3-10 semanas	Deshalogenación
Organofosforados	Insecticidas	7-8 semanas	Hidrolisis de ésteres

2.2.3.2 Residuo de plaguicida

Procesos tales como la degradación, la volatilización y la adsorción, junto con otros procesos de transporte, como la escorrentía y lixiviación, son los responsables de la aparición de residuos de plaguicidas en la atmósfera, aguas superficiales y subterráneas, suelo, plantas, etc.

Según (OMS, 1990) se entiende por residuo de plaguicida, aquellas sustancias concretas que se encuentran en los alimentos, los productos agrícolas o los piensos como resultados del uso del plaguicida. El término incluye tanto los derivados del plaguicida, como los productos de conversión, los metabolitos, los productos de reacción y las impurezas que se consideran de importancia toxicológica¹⁸.

2.2.4 Metabolitos de compuestos organofosforados

Los metabolitos de los compuestos organofosforados suelen ser más tóxicos que el compuesto parental. Se estudiaron pesticidas organofosforados y se detectó que sus metabolitos polares (Tps) son más tóxicos y por tanto de mayor relevancia ambiental, puesto que sus volúmenes de rompimiento son mucho más lentos que el compuesto inicial. Muchos de estos compuestos se incluyen en la lista de la EPA como contaminantes potenciales¹⁹. Entre los compuestos organofosforados:

2.2.4.1 Paratión

Es un plaguicida organofosforado prohibido en todas sus formulaciones y usos por ser dañino para la salud humana; animal y el ambiente.

Este éster ha sido usado mundialmente como alternativa para el DDT y otros pesticidas orgánicos clorados. Lamentablemente este pesticida presenta el inconveniente que no se degrada rápidamente en aguas naturales²⁰.

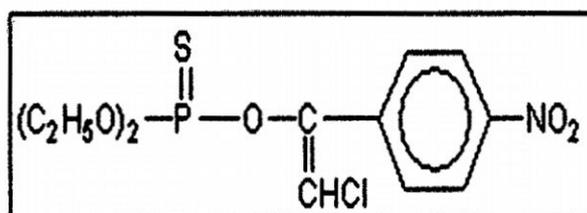


Figura 2. Fórmula global de paratión²⁰.

a) **Sinónimos:** O,O-Diethyl O-p-Nitrophenyl thiophosphate

Diethyl 4-Nitrophenyl Phosphorothionate

b) **Formulación común:** C₁₀H₁₄NO₅PS

c) Degradación del paratión

El paration se degrada en el suelo mediante procesos biológicos y químicos en un plazo de varias semanas. La degradación es más rápida en suelos inundados. El paratión puede ser susceptible de fotodegradación. El metabolito activo paraxón (que es el producto de la fotodegradación), es más tóxico que el paration. La tasa de degradación del paratión aumenta cuanto mayor es el pH (en medios alcalinos).

La adsorción en partículas en suspensión y sedimentos del fondo es el principal proceso de eliminación en aguas abiertas. El paratión suele desaparecer en una semana. La semidesintegración del paratión mediante fotodegradación en el agua es de uno a diez días¹⁵.

d) Productos de la degradación: *p*-nitrofenol y el ácido dietiltiofosfórico¹⁵.

2.2.4.2 Paratión-metilo

El paration-metilo es un plaguicida organofosforado; se usa más o menos tan ampliamente como el paratión y es muy similar en sus propiedades físicas y químicas; no obstante, se hidroliza e isomeriza más fácilmente que éste, por lo que es menos estable como insecticida y ligeramente menos tóxico para los mamíferos; se usa principalmente en los cultivos de café y cítricos contra pulgones y catarinitas; se encuentra disponible en fórmulas que contienen desde menos de 1% hasta más del 95% de material puro²⁰.

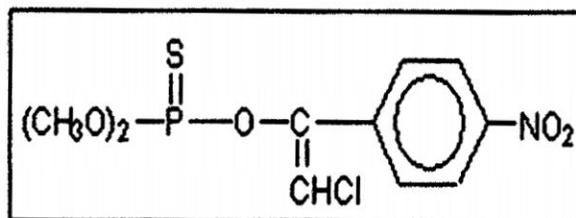


Figura 3. Fórmula global de metilparatión²⁰.

a) **Sinónimos:** O,O-Dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate

b) **Formulación común:** C₈H₁₀NO₅PS

c) Degradación del metil paratión

El paratión-metilo se degrada en el suelo y el agua como resultado de procesos biológicos y químicos. La pérdida de este producto en el suelo se debe sobre todo a la biodegradación (la semidesintegración varía entre diez días y dos meses). La degradación aumenta cuanto mayor es la temperatura y la exposición a la luz del sol. La principal excepción corresponde a los derrames, en los que la degradación sólo se produce al cabo de muchos años¹⁵.

Los principales procesos empleados para eliminar el compuesto del agua son la biodegradación y la fotólisis. En un período de dos a cuatro semanas tiene lugar el 100 por ciento de la degradación. La hidrólisis se produce (del 5 al 11 por ciento) en cuatro días en ríos y más lentamente en sistemas marinos. El paratión-metilo se degrada mediante fotólisis directa en aguas naturales (semidesintegración de ocho días en verano y de 38 días en invierno)¹⁵.

d) Productos de la degradación: 4-nitrofenol y metil paraxón.

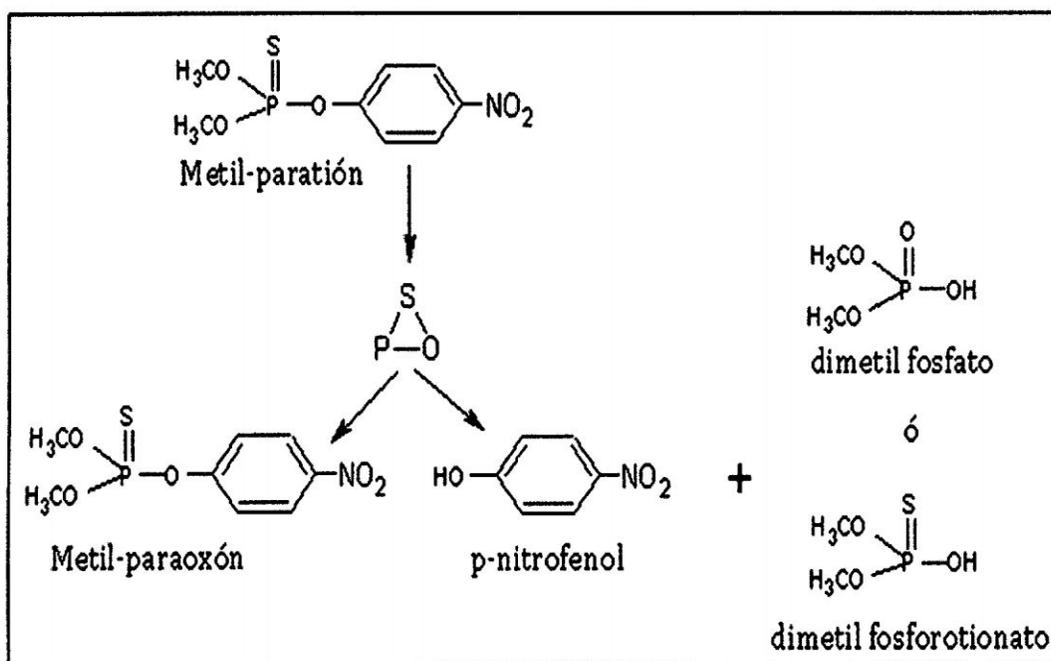


Figura 4. Biotransformación del metil paratión a metabolito *p*-nitrofenol²¹.

2.2.5. Nitrofenol

Es un compuesto nitroaromático que tienen origen humano derivado de las industrias y son altamente utilizados en la síntesis de pesticidas².

Es un compuesto químico orgánico perteneciente a la familia de fenoles nitrados, con anillos de bencenos que contienen un grupo hidroxilo (-OH) y al menos un grupo nitro (-NO₂) unido al anillo. Presenta tres formas isómeras²².

- *o-nitrofenol* (*orto*-nitrofenol o 1-hidroxi-2-nitrobenceno), un sólido cristalino de color amarillo (pf 46 °C).
- *m-nitrofenol* (*meta*-nitrofenol o 1-hidroxi-3-nitrobenceno), un sólido de color amarillo (pf 97 °C) y el padre fármaco ácido aminosalicílico .
- *p-nitrofenol* (*para*-nitrofenol o 1-hidroxi-4-nitrobenceno), cristales de color amarillo (pf 114 °C), es un precursor del herbicida fluorodifeno para el arroz y plaguicida paratión y metil paratión²².

2.2.5.1 Síntesis del nitrofenol

La nitración del fenol con ácido nítrico diluido a 20 °C, produce una mezcla de isómeros "orto" y "para", con cierto predominio del primero; ambos isómeros se obtienen de la mezcla de reacción en suficiente estado de pureza, merced a que pueden separarse fácilmente por destilación con vapor²³.

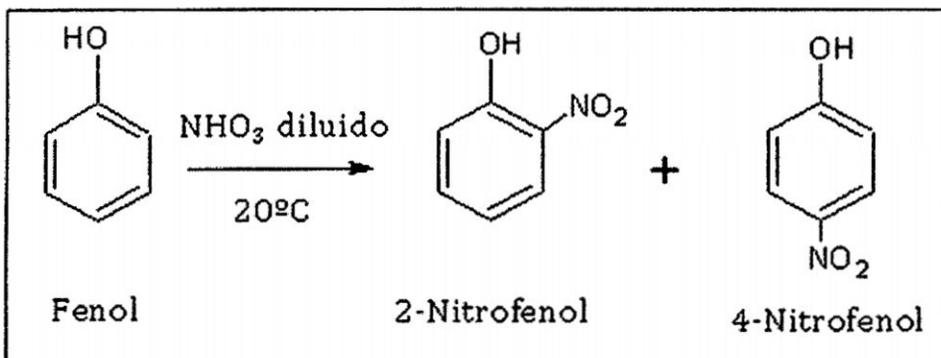


Figura 5. Síntesis del *p*-nitrofenol²⁴.

2.2.5.2 El *p*-nitrofenol

Denominado también 4-nitrofenol, su nombre químico es 1-Hydroxy-4-nitrobenzol y su fórmula química: $C_6H_5NO_3$ ²⁵.

El *p*-nitrofenol tiene aspecto de cristales entre incoloros y amarillo pálido, de olor característico y una solubilidad en el agua de 16 g/L a 25 °C; Punto de ebullición (se descompone): 279 °C; Punto de fusión: 113 °C y una densidad relativa (agua=1), la sustancia es un oxidante fuerte y reacciona con materiales combustibles; la sustancia se puede absorber por inhalación y a través de la piel, se caracteriza por ser una sustancia tóxica, peligrosa para la salud y el medio ambiente²⁵.

2.2.5.3 Uso

El *p*-nitrofenol es usado principalmente en la síntesis de insecticidas (paratión y metil paratión), fungicidas (dinoseb), herbicidas nitrofenólicos, medicamentos, y tinturas^{5, 24}.

Es el principal metabolito del paratión y ha sido aceptado como biomarcador para monitorear humanos expuestos a metilparatión y paratión⁵.

La producción anual de *p*-nitrofenol o 4-nitrofenol es de 20 millones de kilogramos. (el 98% se utiliza como intermediario en la elaboración de metil , etil, paratión, 1 % en la elaboración de N-acetil-*p*-aminofenol (APAP) y el 1 % restante en tintes para cuero, tintes de oxidianilina y otras aplicaciones⁵.

2.2.6 El *p*-nitrofenol como fuente contaminante del medio ambiente

Todo el mundo está expuesto a bajos niveles de nitrofenoles en el aire, agua y suelo. Se han detectado nitrofenoles en el aire (que se pueden formar como resultado de reacciones fotoquímicas atmosféricas entre el benceno y el monóxido de nitrógeno)^{5, 26}.



El *p*-nitrofenol o 4-nitrofenol aparece en aguas residuales agrícolas y suelos debido a la degradación de los plaguicidas como paratión y fluoridifen y demoran mucho tiempo en degradarse en la profundidad del suelo y en el agua subterránea²⁷.

Para la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el *p*-nitrofenol es un contaminante ambiental prioritario por su toxicidad (LD₅₀, 247 mg/L y por piel p20 mg/kg)¹. El impacto ambiental de estos compuestos es tal, que la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) considera once fenoles como contaminantes prioritarios, y entre ellos se encuentran diversos clorofenoles y nitrofenoles²⁴.

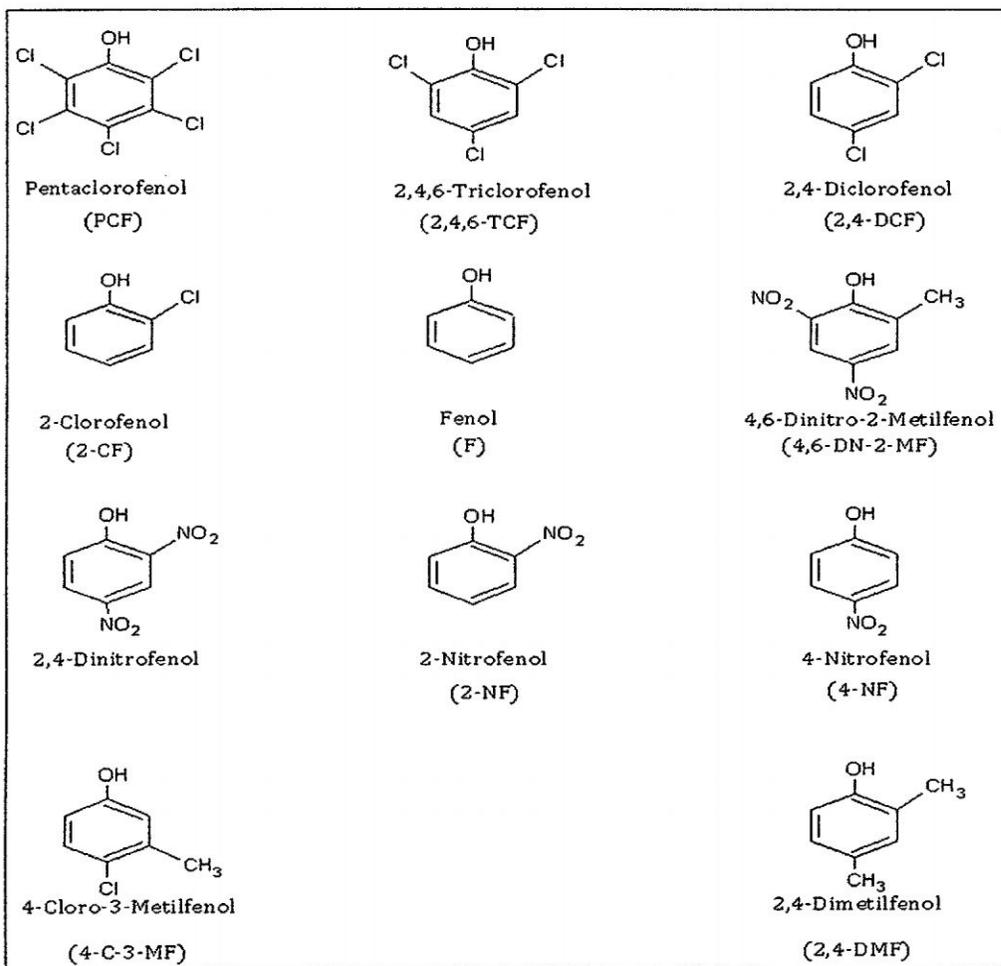


Figura 6. Lista de fenoles contaminantes prioritarios²⁴.

a) Información Ecológica

Los nitrofenoles son tóxicos para plantas y animales y son considerados por la agencia de protección ambiental de los estados unidos (USEPA) como contaminantes prioritarios²³.

b) Ecotoxicidad

Test EC₅₀ (mg/L):

Bacterias (*photobacterium phosphoreum*) = 11 mg/L; Extremadamente tóxico.

Bacterias (*E.coli*) = 100 mg/L; clasificación extremadamente tóxico.

Peces = 46 mg/L; clasificación extremadamente tóxico.

Crustáceos (*Daphnia magna*) = 42 mg/L; clasificación extremadamente tóxico²³.

c) Medio receptor:

Riesgo para el medio acuático = Alto

Riesgo para el medio terrestre = Medio

Se recomienda no permitir su incorporación al suelo ni acuíferos. Es un producto contaminante del agua²³.

Tabla 3: Nivel de toxicidades del p-nitrofenol²⁷.

Compuesto	Toxicidad	Referencias
2-nitrofenol	LC ₅₀ = 0,289 ^a LC ₅₀ = 0,565 ^b	(Yen y col.,2001)
4-nitrofenol	LC ₅₀ = 0,056 ^a LC ₅₀ = 0,092 ^a	(Yen y col.,2001)
4-nitrofenol	20 mg L ⁻¹ CE (l) 50-48h ^c	(Randall y col.,1980)
4-nitrofenol	EC ₅₀ = 64 mg L ⁻¹	(Concetta Tomei y col.,2003)

^a Daphnia.

^b Carp.

^c Correspondiente a la concentración que mata en 48h el 50% de *daphnia magna*.

Los nitrofenoles además de ser sustancias tóxicas son sustancias muy poco biodegradables. En las Tablas 3 y 4 se muestran datos de biodegradabilidad obtenidos por diferentes investigadores.

Tabla 4. Biodegradabilidad del *p*-nitrofenol o 4-nitrofenol en función de la relación DBO₅/DQO ²⁷.

Concentración (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	DBO ₅ (mg L ⁻¹)	DBO ₅ /DQO	Referencias
139	215	14	0,07	(Hsu y col.,2004)
2000	3400	170	0,05	(Yoon y col.,2001)

Tabla 5. Biodegradabilidad en función de la relación DBO₅/TOC ²⁷.

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)	TOC (mg L ⁻¹)	DBO ₅ (mg L ⁻¹)	DBO ₅ /TOC	Referencia
2-nitrofenol	200	81	4	0,05	(Takahashi y col. 1993)
4-nitrofenol	200	120	4	0,03	

2.2.7 Principales vías de exposición de *p*-nitrofenol

- Tomando agua contaminada cerca de sitios de desechos peligrosos y de vertederos²⁶.
- Respirando aire contaminado durante su aplicación, o tomando agua contaminada cerca de áreas agrícolas donde se han aplicado ciertos fungicidas.
- A través de niveles muy bajos de nitrofenoles en el aire, agua y el suelo.
- Respirando aire contaminado con niveles más altos en el trabajo, especialmente durante derrames²⁶.

2.2.7.1 Efectos peligrosos de *p*-nitrofenol para la salud

La exposición a *p*-nitrofenol presenta un alto riesgo para la salud, genera daños en el hígado y el riñón, irritación en los ojos y en la piel⁵.

El *p*-nitrofenol es dañino si es inhalado, absorbido continuamente por la piel o si es ingerido, por inhalación produce irritación en las vías respiratorias, en contacto con la piel y en contacto ocular produce irritaciones, por ingestión produce náuseas, irritación en mucosas de la boca, garganta, esófago y tracto intestinal²⁷.

Los vapores pueden causar irritación en los ojos, piel, membranas, mucosas y vías respiratorias. La absorción interna al cuerpo origina la formación de metahemoglobina la cual en concentraciones suficientes causa cianosis. Los efectos pueden ocurrir de 2 a 4 horas, dependiendo de la intensidad y duración de la exposición, los efectos pueden ser perjudiciales produciendo irritación severa y destructiva a los tejidos. Estudios en animales han evaluado los efectos de los nitrofenoles, las ratas que respiraron niveles moderados de *p*-nitrofenol durante dos semanas desarrollaron una enfermedad de la sangre que redujo la habilidad de la sangre para transportar el oxígeno a los tejidos y órganos. Sin embargo, estas anomalías desaparecieron pocos días después de que la exposición cesó. No se observaron otros efectos perjudiciales en otros sistemas u órganos. Cuando se aplicaron grandes cantidades de *p*-nitrofenol o 4-nitrofenol sobre la piel o en los ojos de animales se observó irritación en ambos lugares. Es muy posible que estos efectos se deban a la gran cantidad que se aplicó. Las cantidades de nitrofenoles que produjeron efectos perjudiciales en animales son cientos a miles de veces mayores que los niveles a los que la población general está expuesta normalmente.

Los fenómenos observados en personas por inhalación del 4-nitrofenol son sensación de quemazón, vértigo y debilidad. La inhalación en altas concentraciones puede originar un aumento del metabolismo. También puede absorberse por la piel. En contacto con los ojos produce enrojecimiento y dolor²⁷.

2.2.7.2 Examen médico de exposición a *p*-nitrofenol

El examen de análisis para medir los niveles de *p*-nitrofenol en la orina y en la sangre sólo se detectará cuando la exposición ha sido muy reciente porque el *p*-nitrofenol es eliminado del cuerpo en la orina en pocas horas²⁸.

.Tabla 6. Principales indicadores biológicos de exposición a plaguicidas²⁸.

Plaguicidas	Sustancias analizadas	Medio biológico
Organoclorados		
Aldrin	Dieldrin	sangre
Clordano	Clordano	sangre
DDT	DDT, DDE, DDO	orina
Dieldrin	Dieldrin	sangre
Hexaclorobenceno	Hexaclorobenceno	sangre
Lindano	Lindano	sangre
Organofosforado		
	Colinesterasa	sangre
	Esterasa Neurotica	sangre
	Alquilfosfatos	sangre
Metil paratión	<i>p</i>-nitrofenol	orina
Paratión	<i>p</i>-nitrofenol	orina
Ronel	2,4,5 triclorofenol	orina
Carbamatos		
Carbanil	1 naftol	orina
Propoxur	2 isopropoxifenol	sangre
	colinesterasa	sangre
Cloronitrofenoles		
Dinitrocresol	Dinitro- <i>o</i> -cresol	sangre
Pentaclorofenol	Pentaclorofenol	sangre

2.2.8 Degradación del *p*-nitrofenol

El *p*-nitrofenol puede sufrir cambios fisicoquímicos como volatilización y fotodegradación en aguas superficiales claras (vida media de 2-14 días), siendo más rápido cuando el agua es ácida o contiene iones de NO_3^- y NO_2^- ⁹. Sin embargo la biodegradación es el principal mecanismo de remoción del *p*-nitrofenol⁵.

La velocidad de degradación de *p*-nitrofenol es menor en sistemas marinos donde se ha reportado con una vida media de 1 a 3 años mientras en aguas continentales la vida media es de 1 a 8 días aproximadamente. La vida media del *p*-nitrofenol disminuye cuando las poblaciones microbianas son aclimatadas y el *p*-nitrofenol puede ser degradado completamente en un día⁵.

2.2.9 Géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol

La presencia del grupo nitro en el *p*-nitrofenol incrementa su resistencia a la degradación, sin embargo se ha reportado muchos géneros bacterianos que tienen habilidad para degradarlo, entre ellos se incluyen: *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Artrobacter* y *Bacillus*. La degradación aeróbica del *p*-nitrofenol a menudo suministra carbono, nitrógeno y energía^{29,30}. El metabolito inicial de la degradación de *p*-nitrofenol varía dependiendo del organismo²⁹.

Artrobacter sp degrada *p*-nitrofenol por la vía 1,2,4-bencenotriol; *Moraxella* puede degradar por la vía benzoquinona²⁹. La diferencia del metabolito inicial producido depende de la estrategia utilizada para remover o transformar el grupo nitro.

El *p*-nitrofenol es abundante en la naturaleza como resultado de la degradación de plaguicidas como el paratión muy utilizado en el pasado. Algunos stirpes de *flavobacterium* y *pseudomonas diminuta* poseen paratión hidrolasa y pueden degradar este compuesto xenobiótico vía nitrocatecol. Los microorganismos

llevan el ataque oxidativo mediante oxigenasas que insertan átomos de oxígeno en el anillo nitroaromático este proceso se lleva en aerobiosis³¹.

El 4-nitrofenol está presente en el ambiente ya que se forma a partir de la transformación (química o biológica) del paratión que es un plaguicida ampliamente usado se han descrito rutas metabólicas de su degradación

- Formación de hidroquinona, que es metabolizada de una ruta tipo meta.
- Formación de 4-nitro-catecol que sufre una reacción de sustitución (liberándose nitrito) con una escisión posterior de tipo orto³¹.

La bacteria roja fotosintética *Rhodobacter capsulatus* puede metabolizar distintos compuestos aromáticos del fenol entre los cuales se encuentra el *p*-nitrofenol.

Este compuesto xenobiotico es mineralizado en condiciones de microaerobiosis en la luz y es utilizado como fuente de nitrógeno.

Las enzimas que participan en la degradación aeróbica de compuestos aromáticos son las monoxigenasas (hidroxilasas) y dioxigenasas que catalizan la hidroxilación y posterior apertura del anillo³².

La salida del grupo nitro del anillo aromático es un punto crucial en la degradación de estos compuestos habiéndose descrito varios tipos de ruta:

- Se puede eliminar en forma de nitrito por acción de las monoxigenasa.
- Se puede reducir en el primer paso por la nitroreductasa y formándose el aminoderivado correspondiente y liberándose en pasos posteriores al grupo amino en forma de amonio.
- El grupo nitro puede reducirse parcialmente produciendo hidroxilamina que a continuación sufre una reducción de sustitución con posterior metabolización del hidroxiderivado³².

2.2.10. Características de los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol

1. **Sphingomonas:** los microorganismos de este género son bacilos no esporulados gramnegativos que tienen un único flagelo polar cuando son polares. Son amarillos, aerobios estrictos y producen catalasa.

Las bacterias pertenecientes al género *sphingomonas* son ubicuas en el suelo, el agua y los sedimentos, y se sabe que las cepas aisladas de estos ambientes descomponen los compuestos aromáticos y por lo tanto, se espera que se las utilice como un remedio biológico para el medio ambiente. Actualmente los miembros de *sphingomonas* se dividen en *sphingobium*, *Novosphingobium* y *sphingopyxis* además del género *sphingomonas*³³. Tienen las siguientes características:

- Bacilo móvil.
- Las colonias que crecen en medio agar sangre tienen pigmento amarillo
- El crecimiento es lento y pueden observarse colonias pequeñas a las 24 horas de incubación.
- El crecimiento ocurre a 37°C, pero no a 42°C, y el óptimo ocurre a 30 °C.
- Reacción oxidasa positivo³³.

2. **Alcaligenes:** son un género microbiológico de bacterias gramnegativas, aeróbicas, incluidas en el orden Burkholderiales. Son los primeros géneros de bacilos gramnegativos no fermentadores, han sido clasificados por lo menos en 15 familias que abarcan alcaligenaceae y entre las características principales:

- Son bacilos móviles con flagelo peritricos.
- Reacción oxidasa positivo.
- Se desarrollan en agar MacConkey, las colonias tienen tendencia a la invasión³³.

3. Acinetobacter: son cocobacilos inmóviles, gramnegativos, no fermentadores, una característica útil para diferenciar de algunos otros no fermentadores:

- Son cocobacilos inmóviles.
- La morfología en las coloraciones de Gram de las células gramnegativas aparecen con frecuencia como diplococos.
- Reacción oxidasa negativo.
- La mayoría de las cepas se desarrollan en agar MacConkey y produce un leve tinte rosado.
- Son no pigmentadas cuando crecen en agar sangre³³.

Es un género distribuido ampliamente en el medio ambiente, en diferentes tipos de suelo y agua, ha sido reportado como especie capaz de desnitrificar de manera lenta y débil³⁴.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de puntos de muestreo de suelos de cultivo de coca

Las muestras de suelo de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" fueron recolectadas en el Centro Poblado de Mayapo, jurisdicción del Distrito de LLochegua ubicada en la Provincia de Huanta, Departamento de Ayacucho, que se encuentra en una altitud promedio de 503 msnm, con una temperatura promedio de 24 °C, el suelo está conformado de una estructura limosa de granos finos³⁵. El muestreo se realizó en octubre de 2011 en un periodo de dos días.

3.2. Muestra y sistema de muestreo

- El estudio se realizó con 3 unidades de muestra, cada uno conteniendo aproximadamente 2 kg de tierras de cultivo de coca, tomadas de tres terrenos con cultivo de *Erithroxylum coca* "coca". Luego de seleccionar el terreno se procedió a muestrear a través de sub muestreos cuyos puntos fueron distribuidos de manera equitativa en todo el terreno, fueron tomadas por conveniencia.
- Los criterios de inclusión para tomar las muestras fueron: zona de mayor producción de *Erithroxylum coca* "coca"³⁶, ubicación geográfica de mayor uso de agroquímicos^{37, 38} y edad del cultivo.

3.3. Métodos para la recolección de datos

3.3.1. Obtención de muestras

- Una vez definidas los puntos de sub muestreos (10 distribuidos en todo el terreno) se procedió al muestreo según los siguientes pasos:
- Se retiró la capa superficial de tierra de unos 10 a 15 cm, con ayuda de una paleta desinfectada.
- Se tomó aproximadamente 200 g de suelo, entre los 10 y 15 cm de profundidad, luego se introdujeron en una bolsa de polietileno nueva, obteniéndose finalmente una muestra de aproximadamente 2 kg.
- Las bolsas conteniendo las muestras fueron colocadas en “cooler” luego transportadas a una temperatura ambiente, por un periodo de tres días al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para su respectivo procesamiento.

3.3.2. Aislamiento de microorganismos degradadores de *p*-nitrofenol

- En condiciones asépticas se tamizó la muestra de suelo recolectada de los cultivos de coca, con malla de 2 x 2 mm de porosidad para separar las piedras y partículas grandes.
- Se pesó 10 g de suelo tamizado, se diluyó en 90 mL de agua peptonada, luego se agitó por 5 a 10 minutos y se dejó decantar.
- 10 mL del sobrenadante fue inoculado en frascos conteniendo 90 mL del medio mineral Busnell Hass, suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol.
- Los frascos conteniendo los cultivos fueron protegidos con papel aluminio, incubados a temperatura ambiente en agitación \pm 200 RPM por 8 días.

- Transcurrido el tiempo se evidenció el crecimiento microbiano por turbidez y la degradación del *p*-nitrofenol por la desaparición del color amarillo en el medio mineral suplementado con *p*-nitrofenol inicialmente.
- Enseguida se procedió al aislamiento de las bacterias en medio agar Busnell Hass suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol por la técnica de diseminación.
- Las placas fueron incubadas a 30 °C por 48 horas en posición invertida.
- Una vez obtenidas las colonias éstas fueron sembradas en otras placas conteniendo agar nutritivo, por la técnica de agotamiento en superficie. Para lograr una mayor purificación. Las colonias obtenidas fueron repicadas en viales y conservadas como cepario.
- Se obtuvo consorcios, con las cepas aisladas de muestras de cada terreno (3 consorcios).

3.3.3 Cálculo de la concentración de *p*-nitrofenol mediante curva patrón

- Se prepararon 100 mL de soluciones de *p*-nitrofenol a las siguientes concentraciones: 0,5, 1, 4, 10, 12 mg/L utilizando agua destilada como diluyente.
- Se transfirieron 10 mL de cada concentración en tubos de ensayo 16 mm x 150 mm.
- Luego se prosiguió a realizar la lectura con luz de 380 nm de longitud de onda con el espectrofotómetro “espectrofotometer 1200” serie ÚNICO, usando como blanco agua destilada.
- Con los valores obtenidos se prosiguió a determinar la curva patrón.

3.3.4. Evaluación de la capacidad biodegradativa de *p*-nitrofenol.

a) Preparación del inóculo

- Las cepas de cada consorcio fueron cultivadas en tubos conteniendo 10 mL de caldo nutritivo incubados a 30°C por 48 horas; luego estos cultivos fueron mezclados en un matraz de 250 mL; obteniéndose 3 matraces conteniendo cada uno 1 consorcio.

b) Medición de la concentración de la capacidad biodegradadora de *p*-nitrofenol

- Del matraz se tomó 1mL del inóculo y se inocularon a frascos conteniendo 100 mL de caldo Busnell Hass, suplementado con *p*-nitrofenol a diferentes concentraciones de 4, 7, 10, 12 mg/L, respectivamente, con tres repeticiones en cada caso. Se empleó el diseño experimental factorial
- Paralelamente se prepararon otros frascos con 100mL de caldo Busnell Hass, suplementado con *p*-nitrofenol a diferentes concentraciones de 4, 7, 10, 12 mg/L a los cuales no se inoculó el consorcio microbiano (ensayo blanco).
- Todos los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente en constante agitación \pm 200 RPM durante 8 días.
- A partir de la hora cero, cada 12 horas se determinó la concentración de *p*-nitrofenol de cada uno de los frascos de ensayo.
- Se tomó en un tubo de ensayo de 16 mm x 150 mm, 5 mL de cultivo Busnell Hass suplementado con *p*-nitrofenol de diferentes concentraciones.
- Se agregó unas gotas de NaOH (1N) para ajustar el pH a 9.

- Luego se centrifugó a 3600 rpm por 15 minutos para separar el sedimento de la muestra que podría interferir en la lectura en el espectrofotómetro.
- Luego se prosiguió a realizar la lectura a 380 nm con el espectrofotómetro “espectrofotometer 1200” serie ÚNICO, previamente usando como blanco agua destilada.
- Con los valores de la lectura se determinó la cantidad de *p*-nitrofenol, de acuerdo a la ecuación y gráfico de la curva patrón.

3.3.5. Identificación de cepas degradadoras de *p*-nitrofenol

a) Morfología de las colonias. Las bacterias aisladas se han caracterizado y diferenciado según las características culturales como: forma, borde, elevación, textura y color de las colonias. Juntamente con la descripción macroscópica se realizó la caracterización microscópica mediante la coloración Gram y su morfología.

b) Identificación bioquímica de géneros. Para identificar bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol se realizó la verificación de crecimiento en agar MacConkey y agar sangre y las pruebas bioquímicas de: oxidasa, TSI, LIA, motilidad y urea.

3.3.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos en los procedimientos anteriores fueron presentados en tablas e histogramas. Se realizó análisis de estadística descriptiva inferencial como fue el análisis de varianza con un 95% de confianza utilizando software SPSS Statistics 20 y Excel 2010.

V. RESULTADOS

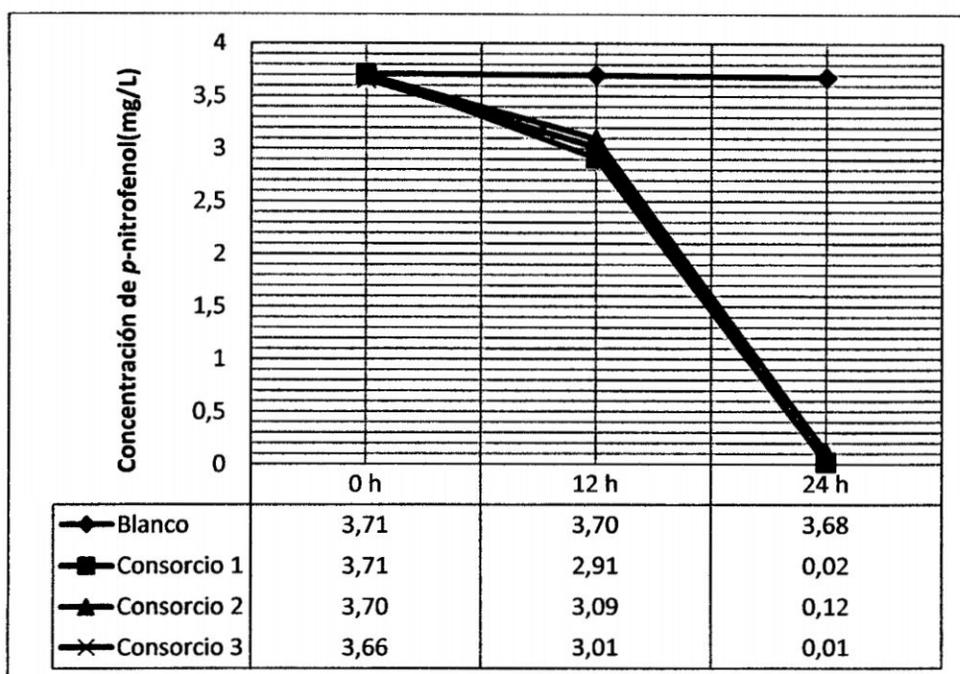


Figura 7. Biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 4 mg/L según horas transcurridas.

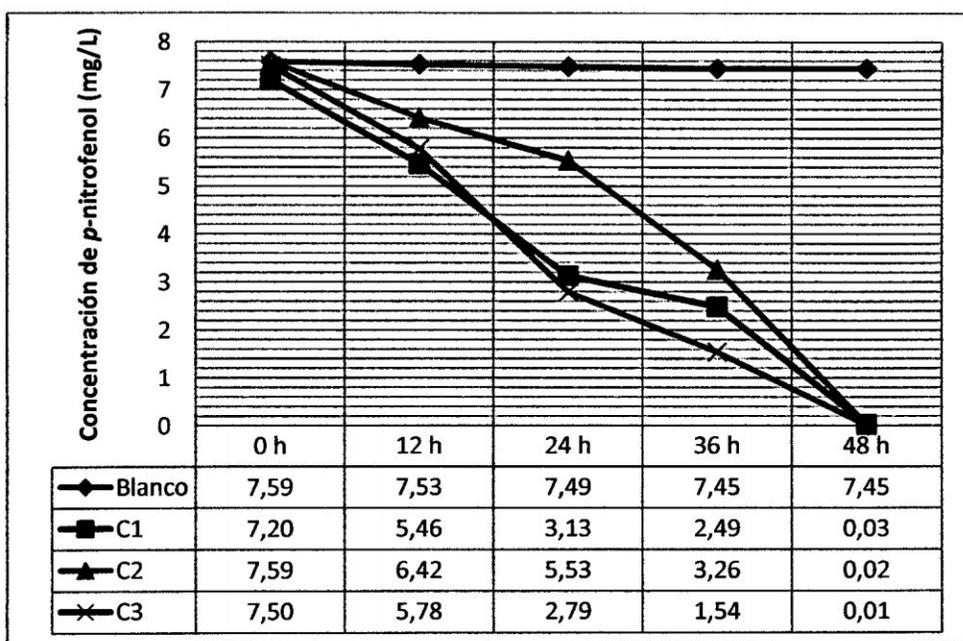


Figura 8. Biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 7 mg/L según horas transcurridas.

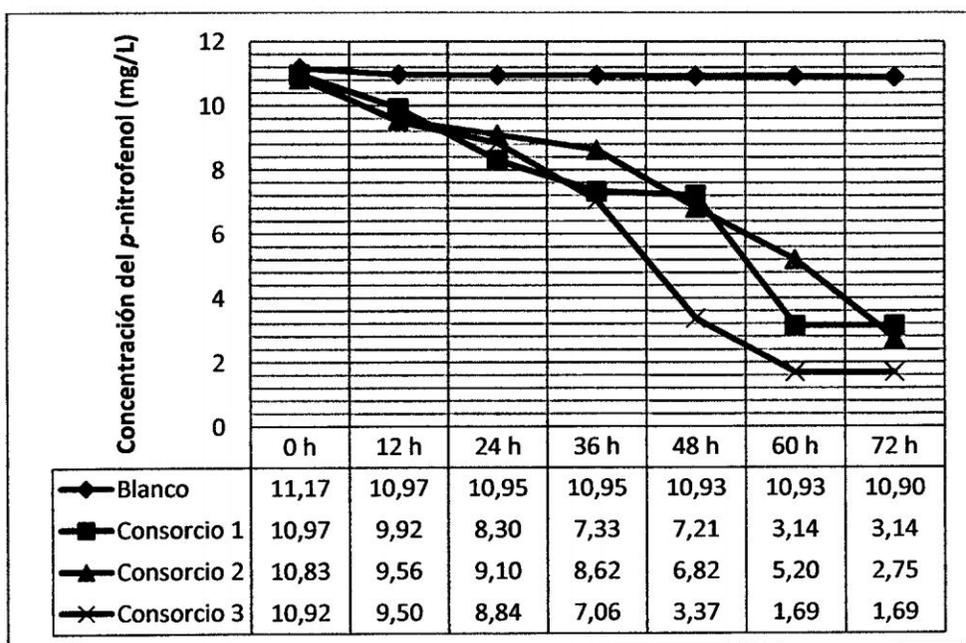


Figura 9. Biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 10 mg/L según horas transcurridas.

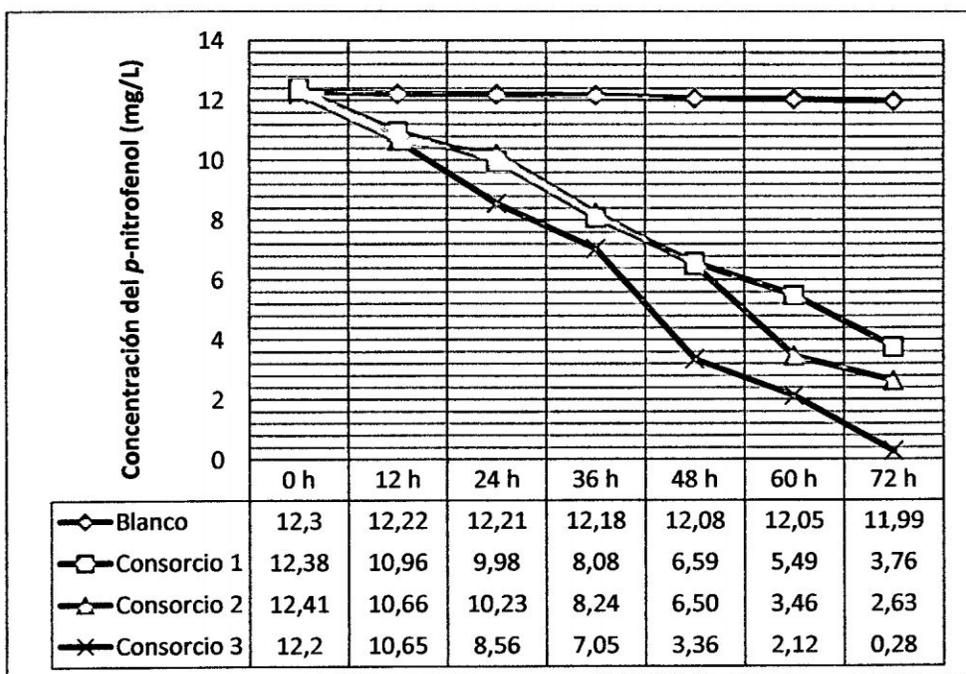


Figura 10. Biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 12 mg/L según horas transcurridas.

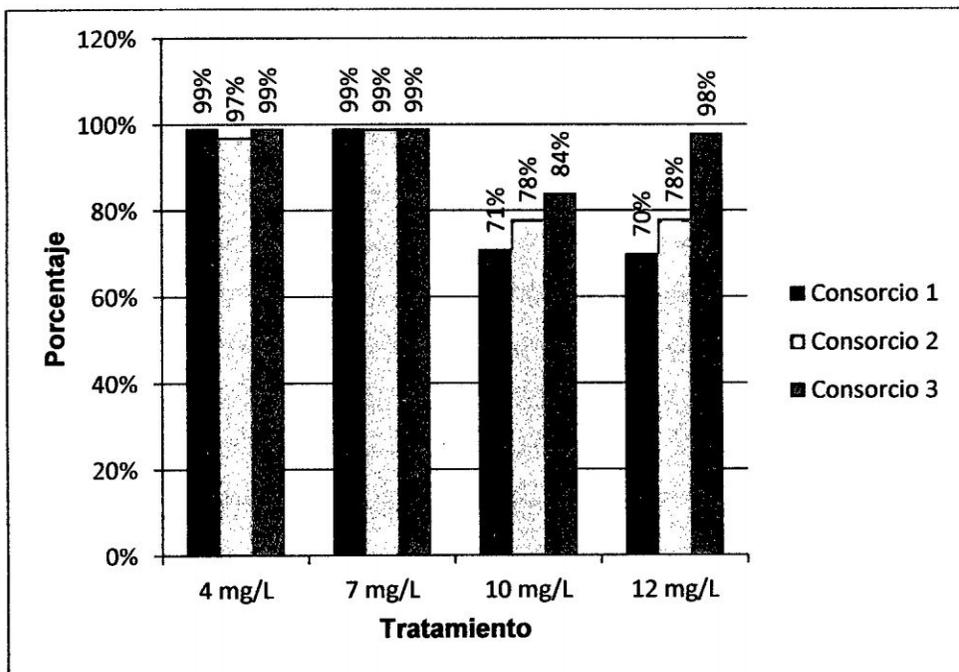


Figura 11. Porcentaje de biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo, en relación a diferentes tratamientos

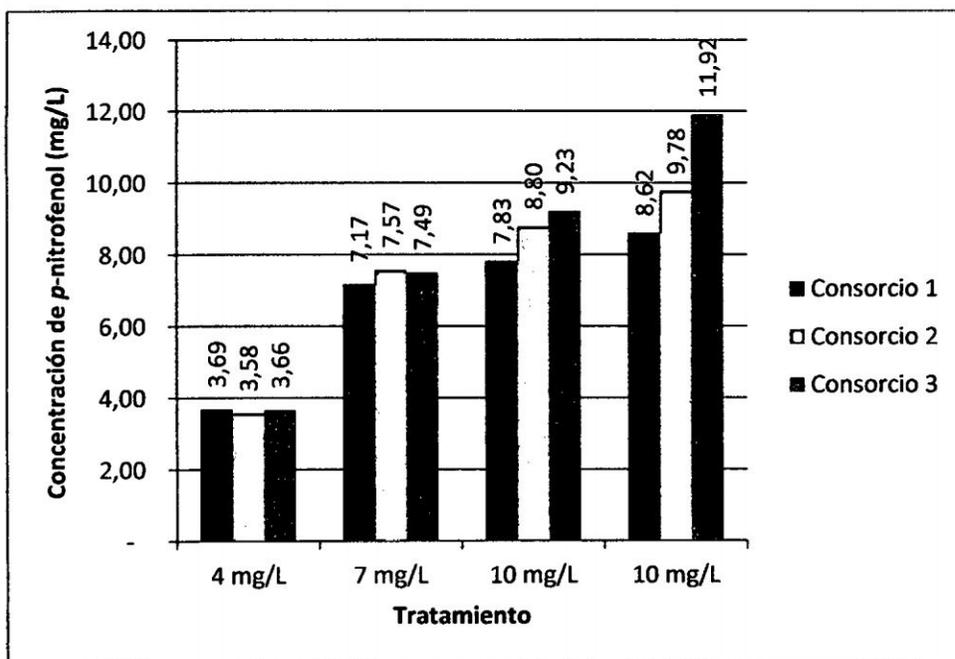


Figura 12. Cantidad total de *p*-nitrofenol degradado por consorcio microbiano en relación a diferentes tratamientos.

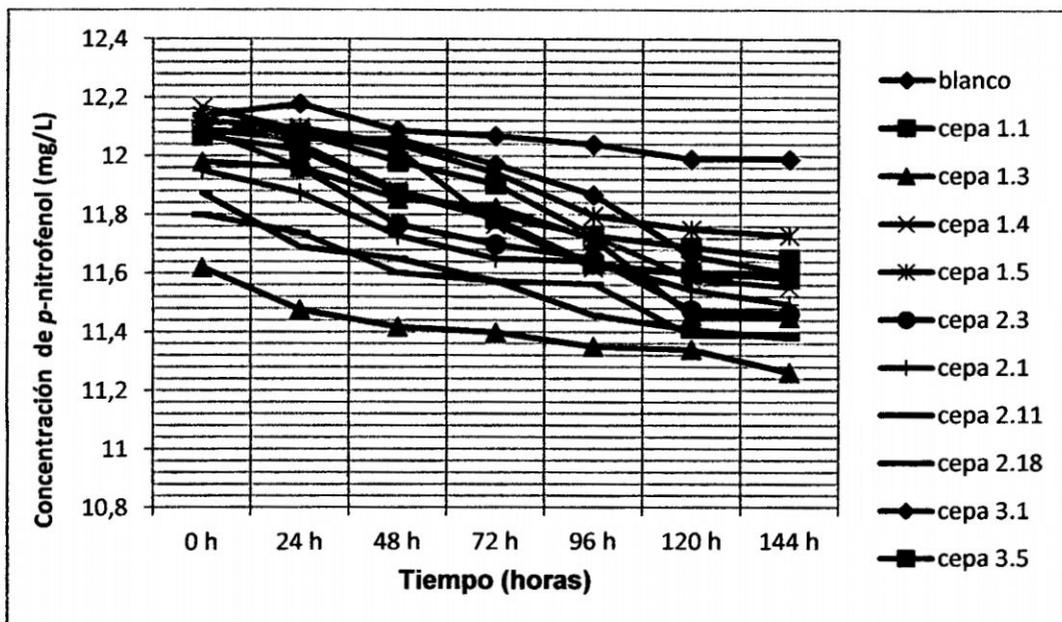


Figura 13. Biodegradación de *p*-nitrofenol por cepas individuales aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 10 mg/L según horas transcurridas.

Tabla 7. Características culturales de cepas bacterianas degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho. 2012

N°	Código de cepas	Características culturales	Morfología	Gram
1	1.1	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color transparente de consistencia seca	Bacilos	-
2	1.3	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-
3	1.4	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color transparente de consistencia seca	Bacilos	-
4	1.5	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color transparente de consistencia seca	Bacilos	-
5	2.10	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-
6	2.3	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-
7	2.18	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-
8	3.1	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color transparente de consistencia seca	Bacilos	-
9	3.2	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color amarillo consistencia fresca	Bacilos	-
10	3.5	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color amarillo consistencia fresca	Bacilos	-
11	3.6	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color amarillo consistencia fresca	Bacilos	-
12	3.21	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-

Tabla N° 08. Resultados de pruebas bioquímicas de identificación de bacterias degradadoras de p-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de coca *Erythroxylum coca* del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho 2012.

N°	Características	Cepa											
		1.1	1.4	1.5	3.1	1.3	2.3	2.1	2.18	3.21	3.2	3.18	3.6
1	Tinción Gram	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)
2	Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
3	Crecimiento MacConkey	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Crecimiento Agar Sangre	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	TSI	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
6	LIA	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
8	UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	SIM Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Género	Alcaligenes sp.					Acinetobacter sp.					Sphingomonas sp.	

Tabla 9. Géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de coca *Erythroxylum coca* del Centro Poblado de Mayapo. Ayacucho 2012.

código	consorcio 1	código	Consorcio 2	código	Consorcio 3
1.1	<i>Alcaligenes sp.</i>	2.10	<i>Acinetobacter sp.</i>	3.1	<i>Alcaligenes sp.</i>
1.3	<i>Acinetobacter sp.</i>	2.3	<i>Acinetobacter sp.</i>	3.2	<i>Sphingomonas sp.</i>
1.4	<i>Alcaligenes sp.</i>	2.18	<i>Acinetobacter sp.</i>	3.5	<i>Sphingomonas sp.</i>
1.5	<i>Alcaligenes sp.</i>			3.6	<i>Sphingomonas sp.</i>
				3.21	<i>Acinetobacter sp.</i>

Tabla 10. Porcentaje de los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo. Ayacucho 2012.

Géneros	N°	%
Acinetobacter	5	42%
Alcaligenes	4	33%
Sphingomonas	3	25%
Total	12	100%

V. DISCUSIÓN

Es importante estudiar qué poblaciones microbianas existen en el suelo contaminado ya que estas probablemente ya se habrán adaptado al ambiente contaminado³⁶. En el Valle Rio Apurimac Ene y Mantaro analistas estiman, que anualmente se aplica alrededor 700 mil litros de agroquímicos a los cultivos de coca³⁴. En el Centro Poblado de Mayapo los agroquímicos más utilizados para la producción de hoja de coca son el Gramoxil, Gramoxone, Tamaron, Thiodan Caporal, Monitor, Paration entre otros productos altamente tóxicos³⁵.

Bajo este concepto se decidió extraer la muestra de suelo de cultivo de coca del Centro poblado de Mayapo para posteriormente aislar un consorcio microbiano para la degradación de *p*-nitrofenol.

Bracho⁹, en el 2007 sostiene que una rápida degradación y un periodo corto de aclimatación puede relacionarse a que las comunidades microbianas han estado expuestos al contaminante de interés o compuestos con estructura similar.

Los resultados obtenidos de la biodegradación del *p*-nitrofenol por consorcio microbiano aislados a partir de los suelos de cultivo de coca mostraron una rápida degradación de *p*-nitrofenol.

En la Figura 7, se muestran los valores de biodegradación de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 4 mg/L según las horas transcurridas. A las 24 horas del ensayo la concentración del *p*-nitrofenol es: 0,02; 0,12; 0,01 mg/L

respectivamente realizado por el consorcio bacteriano C1, C2, C3, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano C1, C2, C3 ha logrado reducir 3,66; 3,58; 3,65 mg/L de *p*-nitrofenol respectivamente que equivale a 99 %, 97 % , 99 %, cada uno, respecto a la concentración inicial. Al realizar el análisis de varianza no se obtiene significancia estadística ($\alpha \leq 0,05$) entre los tres consorcios, lo que se interpreta que los tres consorcios son iguales en la degradación del *p*-nitrofenol.

En la Figura 8, se muestran los valores de biodegradación de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 7 mg/L según las horas transcurridas. A las 48 horas del ensayo la concentración del *p*-nitrofenol es: 0,03; 0,02; 0,01 mg/L respectivamente realizado por el consorcio bacteriano C1, C2, C3, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano C1, C2, C3 ha logrado reducir 7,1; 7,5; 7,4 mg/L de *p*-nitrofenol respectivamente que equivale a 99 %, 99 % , 99 %, cada uno, respecto a la concentración inicial. Al realizar el análisis de varianza no se obtiene significancia estadística ($\alpha \leq 0,05$) entre los tres consorcios, lo que se interpreta que los tres consorcios son iguales en la degradación del *p*-nitrofenol.

En la Figura 9, se muestran los valores de biodegradación de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 10 mg/L según las horas transcurridas. A las 72 horas del ensayo la concentración del *p*-nitrofenol es : 3,14; 2,75; 1,16 mg/L respectivamente realizado por el consorcio bacteriano C1, C2, C3, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano C1, C2, C3 ha logrado reducir 7,83; 8,80; 9,23 mg/L de *p*-nitrofenol respectivamente que equivale a 71 %, 78 % , 84 %, cada uno, respecto a la concentración inicial. Al realizar el análisis de varianza se obtiene significancia estadística ($\alpha < 0,05$) entre los tres consorcios, por lo que se realizó la prueba de tukey donde el consorcio

C3 es estadísticamente superior a los otros dos consorcio en la degradación del *p*-nitrofenol.

En la Figura 10, se muestran los valores de biodegradación de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 12 mg/L según las horas transcurridas. A las 72 horas del ensayo la concentración del *p*-nitrofenol es : 3,71; 2,63; 0,28 mg/L respectivamente realizado por el consorcio bacteriano C1, C2, C3, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano C1, C2, C3 ha logrado reducir 8,62; 9,78; 11,92 mg/L de *p*-nitrofenol respectivamente que equivale a 70 %, 78 % , 98 %, cada uno, respecto a la concentración inicial. Al realizar el análisis de varianza se obtiene significancia estadística ($\alpha < 0,05$) entre los tres consorcios, por lo que se realizó la prueba de tukey donde el consorcio C3 es estadísticamente superior a los otros dos consorcio en la degradación del *p*-nitrofenol.

Es importante resaltar que la población microbiana degradadora fue más alta por el consorcio bacteriano C3. Esto permite inferir que las poblaciones microbianas de las muestras de suelo estuvieron expuestas a mayor actividad antropogénica y al contaminante con más frecuencia y las dos muestras de suelos de donde se aislaron el consorcio bacteriano C1 y C2 están menos expuestos a este contaminante. Esto nos podría indicar que la poblaciones microbianas de la muestra de suelo de donde se aislaron el consorcio bacteriano C3 son mucho más eficientes en la remoción de *p*-nitrofenol que los consorcios bacterianos C1 y C2 aisladas de las otras muestras de suelo.

Bracho⁹, en el 2007, obtuvo 90 % de biodegradación del *p*-nitrofenol de una concentración inicial de 10 mg/L en 70 horas por efecto del consorcio microbiano de bacterias asociadas principalmente al género *Pseudomonas*.

Asimismo en nuestra investigación el tiempo máximo para la degradación del *p*-nitrofenol a cargo del consorcio bacteriano según los tratamientos de diferentes

concentraciones es: 24 horas para degradar una concentración de 4 mg/L; removiendo el compuesto en un 99 %, 97 %, 99 % realizado por el C1, C2 y C3 respectivamente; 36 horas para degradar una concentración de 7 mg/L; removiendo el compuesto en un 65 %, 51 %, 78 % realizado por el C1, C2 y C3 respectivamente; 72 horas para degradar una concentración de 10 mg/L y 12 mg/L; removiendo el compuesto en un 70 %, 78 %, 98 % realizado por el C1, C2 y C3 respectivamente. Estos resultados corroboran la eficiencia para metabolizar el compuesto *p*-nitrofenol realizado por los microorganismos en un tiempo máximo de horas coincidiendo que la concentración de 10 mg/L es degradado en un aproximado de 70 horas según el autor anteriormente mencionado.

Al observar la curva de degradación de los dos graficos 9 y 10 se distinguen que inicialmente la degradación transcurre lentamente hasta las 48 h y luego es abrupta este comportamiento se podría explicar la prolongación en el periodo de degradación y se puede relacionar a que inicialmente algunas de las poblaciones encargadas de degradar el *p*-nitrofenol utilizan otras fuentes de carbono más fáciles de asimilar, y una vez se agotan utilizan el *p*-nitrofenol.

Zaidi *et al*³⁹, encontró que la degradación de *p*-nitrofenol con una cepa de *Pseudomonas sp.* GR, se incrementó cuando suplementó con glucosa no obstante con otra cepa de *Pseudomonas sp.* MS se restringió inhibición en presencia de glucosa.

Wiggins *et al*⁴⁰, encontraron que la degradación de *p*-nitrofenol se retrasó como consecuencia del uso preferencial de 2,4-dinitrofenol (DPN), el *p*-nitrofenol solo puede ser mineralizado una vez, el DPN fue eliminado.

Muchos estudios se han centrado en la biodegradación del fenol y encontraron la actividad de un gran número de microorganismos incluyendo bacterias, hongos y actinomicetos. Las especies bacterianas incluidas son *Bacillus sp.*,

Pseudomonas sp., *Acinetobacter sp.*, *Achromobacter sp.*, *Alcaligenes sp.* entre otros, también se han demostrado ser eficaces grupos de hongos en la biodegradación de fenol como *Fusarium sp.*, *Phanerocheate chrysosporium*, *Corious versicol*, *Ralstonia sp.*, *Streptomyces sp.*, etc ².

El *p*-nitrofenol es un compuesto derivado de un fenol y en nuestra investigación las bacterias que crecieron en medios líquidos conteniendo como única fuente de carbono *p*-nitrofenol que fueron aisladas de suelos de cultivo de coca, se identificaron bioquímicamente relacionándose principalmente al género de *Sphingomonas sp.*, *Alcalígenes sp.* y *Acinetobacter sp.*

En la tabla 9, se muestran los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de coca del Centro Poblado de Mayapo conformando consorcios. El consorcio bacteriano C1, está conformado por las bacterias de género *Alcalígenes sp.* y *Acinetobacter sp.*; el consorcio bacteriano C2, está conformado por las bacterias de género *Acinetobacter sp.*; el consorcio bacteriano C3, está conformado por las bacterias de género *Acinetobacter sp.*, *Alcalígenes sp.* y *Sphingomonas sp.*

La biodegradación del *p*-nitrofenol se dio mejor por el consorcio bacteriano C3 posiblemente por los la variedad de géneros encontrados. Desde hace tiempo se conoce que los consorcios microbianos son mucho más eficientes para degradar desechos orgánicos complejos que las cepas individuales de organismos o inclusive mezclas de microorganismos debido a la diversidad de habilidades metabólicas³¹.

Diversos autores han descrito que el género de bacteria *Sphingomonas* son bacterias que mineralizan compuestos nitroaromáticos, estirpes bacterianas capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono, liberando nitrito al medio²⁹.

En la tabla 10, se muestran los porcentajes de los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de coca del Centro Poblado de Mayapo, observándose que de un total de 12 cepas bacterianas, 5 son de género *Acinetobacter* representando un 42 %, 4 son de género *Alcalígenes* representando un 33 % y 3 de género *Sphingomonas* representando un 25 % del total de cepas aisladas. En este resultado se observa que el género *Acinetobacter sp.* predomina en el aislamiento del resto de los otros géneros como *Alcalígenes sp.* y *Sphingomonas sp.*

Tomando en cuenta los distintos puntos de vista de los científicos coincidimos con todos al haber encontrado una diversidad de grupos microbianos, especialmente con Ahumada *et al.*⁸, coincidimos que el género *Acinetobacter* presentan la capacidad de degradar el *p*-nitrofenol.

Todas las bacterias gramnegativas, que poseen mayor incidencia en la degradación del fenol es dada por su capa lipídica y los mecanismos a nivel de membrana, aunque las grampositivas poseen esta capacidad pero en menos frecuencia⁸.

En nuestra investigación todas las bacterias aisladas son gramnegativas con capacidad de degradar el *p*-nitrofenol.

Estos resultados refuerzan al concepto ampliamente reportado acerca de los principales géneros en procesos de degradación del *p*-nitrofenol.

En la figura 13, se muestran las cepa individuales enfrentadas en 10 mg/L de *p*-nitrofenol y se observa que no hubo degradación significativa.

Se ha reportado que sólo del 1-10 % de los microorganismos que se presenta en la naturaleza son cultivables por las técnicas empleadas en los laboratorios. Esto podría explicar los resultados obtenidos de la biodegradación del *p*-nitrofenol por cepas individuales aislados a partir de los suelos de cultivo de

coca mostraron una inhibición en la degradación de *p*-nitrofenol. Pudo estar influenciada por los factores ambientales, nutrientes como algunos autores informan⁵.

Entre los factores que pudieron afectar la biodegradación del *p*-nitrofenol incluyen la concentración del compuesto; en estudios de suelos de Everglades, cuando se ensayaron bajas concentraciones de *p*-nitrofenol (0.01-0.1 mg/L suelo) ocurrió mineralización en una semana; sin embargo al aumentar la concentración *p*-nitrofenol a 10 mg/L no hubo mineralización debido posiblemente que las concentraciones elevadas producen un efecto inhibitorio⁵; sin embargo en nuestra investigación se observó la habilidad de degradación del *p*-nitrofenol conformado por consorcios a diferencia de cepas individuales.

Gemini *et al.*⁶, obtuvo una cepa bacteriana autóctona de *Rhodococcus wratislaviensis* capaz de utilizar *p*-nitrofenol (PNP) como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. La cepa bacteriana seleccionada degradó una concentración inicial de 0.36 mM de *p*-nitrofenol y degradó en 34 horas y al aumentar la concentración de 0.72 mM degradó en 56 horas removiendo el compuesto en 99 %. En esta investigación se demuestra la degradación del compuesto cuando la cepa es enfrentada en concentración de mM de *p*-nitrofenol.

Una de las explicaciones por la cual no hubo degradación del *p*-nitrofenol realizado por cepas es que pudieron haber sufrido de inhibición por sustrato en mayor concentración. Se corrobora esta explicación con Mádigan *et al.*⁴¹ cuando menciona que para el desarrollo y supervivencia de los microorganismos se hacen necesario llevar a cabo procesos de biosíntesis y otras funciones celulares cada organismo necesita diferentes nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos para géneros, pero en todos los casos requieren

macronutrientes (nitrógeno y fósforo) que se necesitan en grandes cantidades mientras que otros micronutrientes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{2+} , K^{2+} , S^{2+}) se proporcionan en menos cantidades y a veces en cantidades trazas.

En cuanto al pH se han reportado algunas cepas de *Pseudomonas* son incapaces de degradar el *p*-nitrofenol a un pH de 8.0, sin embargo cuando se ajusta a 7,0 el *p*-nitrofenol es mineralizado⁵.

Con esta investigación se pretende contribuir al estudio de la microbiología de suelos con el aislamiento e identificación de bacterias nativas del Centro Poblado de Mayapo, asimismo mediante la identificación de especies microbianas en estas zonas se pretende ampliar la gama de microorganismos conocidos contribuyendo así al conocimiento de la biodiversidad de la microbiota de nuestro país que puede ser capaz de producir metabolitos de interés industrial biorremediar suelo contaminados con compuestos tóxicos.

VI. CONCLUSIONES

1. Las cepas bacterianas degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo pertenecen a los géneros: *Sphingomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.*
2. El consorcio microbiano C3 (*Sphingomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.*) logró degradar hasta un 98% en 72 horas a partir de una concentración inicial de 10 y 12 mg/L.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar una investigación con otros tipos de microorganismos que también tengan la capacidad de degradar el *p*-nitrofenol como pueden ser las algas, hongos, actinomicetos, levaduras, etc.
2. Realizar más trabajos de investigación en diferentes lugares principalmente en zonas expuestas a mayor uso de pesticidas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quahiba F. Degradación por medios bacterianos de compuestos químicos tóxicos. Comisión Técnica Asesora en: Ambiente y desarrollo sostenible [Monografía en internet]*, Buenos Aires, 2001 [acceso 08 de setiembre de 2011]; Disponible en: URL:<http://www.um.es/gtiweb/allmetadata/biodegradacion%20toxicos.htm>
2. Spain JC. Biodegradation of nitroaromatics compounds. Annu. Revmicrobiol [revista en internet]* 2010 setiembre a diciembre. [acceso 08 de febrero de 2011]; vol (10) Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.49.100195.002515>
3. Agua que se consume en el VRAE contiene metales de agroquímicos e insumos químicos. Diario Inforegión. San Francisco - VRAE 15 agosto 2011. Normativa:6 Disponible en: <http://www.inforegion.pe/portada/112937/agua-que-se-consume-en-el-vrae-contiene-metales-de-agroquimicos-e-insumos-quimicos/>
4. Chavez L. Efecto del metil partión en la diversidad bacteriana presente en el suelo de una chinampa de Xochimilco [Monografía en internet] México; 2009. [acceso 15 de octubre de 2011]; Disponible en: http://132.248.246.65/tesigrado/consulta/detpaterno.cfm?al_cuenta=8621338
5. Bracho D. Degradación de *p*-Nitrofenol por bacterias en los ríos Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro [Monografía en internet]*, Puerto rico; 2007., [acceso 08 de noviembre de 2011]; Disponible en: URL: URL:<http://grad.uprm.edu/oeg/TesisDisertacionesDigitales/Biologia>
6. Gemini V, Gallego A, Gómez CE, Planes EI, Korol SE. Empleo de procesos biológicos para detoxificar *p*-nitrofenol Hig. Sanid. Ambient. [Revista en internet]* 2006 diciembre [acceso 18 de julio de 2013]; 6 (1). Disponible en: <http://www.salud-publica.es/.../bc510158f645650> Hig.Sanid.Ambient.6.145
7. Castrejón G, Castrejón S, Ortiz H. Crecimiento de bacterias aisladas de suelos agrícolas sobre plaguicidas organofosforados como sustrato. [Monografía en internet]. Morelos; 2006. Disponible en: <http://www.uaemex.mx/Red-mbientales/docs/memorias/Extenso/CA/EC/CAC>
8. Ahumada M, Gomez R. Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría. [tesis]*Pontificia Universidad Javeriana de Facultad de ciencias y Escuela de Microbiología; 2009.
9. Mezarina W, Hurtado P, Wester J. Aislamiento de 5 especies bacterianas y sus parámetros biorremediadores sobre los lixiviados del relleno sanitario de Paccha Universidad de Huancayo. En Libro resúmenes de XVIII Congreso Nacional de Biología de 24 al 29 de Octubre de 2010 Ayacucho- Perú; 2010.
10. Mestas M, Ramirez P, Peceros M. Biodegradación del ión tiocianato empleando bacterias aisladas de aguas tratadas". Universidad Mayor de San Marcos. Lima-Perú. En Libro resúmenes de XVIII Congreso Nacional de Biología de 24 al 29 de Octubre de 2010 Ayacucho- Perú; 2010.
11. Gamboa R. Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos en suelos contaminados de la ciudad de Ayacucho. [tesis de grado]* Escuela de Formación Profesional de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2002.
12. Chuchón E. Biodegradación de carbofuran por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Ayacucho(Perú): Oficina de bibliotecas y revistas, Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga; 2012.
13. Martin A. Introducción a la microbiología del Suelo. 2ª edición Editorial S.A. México; 1980.

14. Seonez M. Contaminación de suelos. Estudio tratamientos y gestión. Editorial Mun. Prensa. España; 1999.
15. Evaluación de la contaminación del suelo: Manual de referencia. [Sede web]* Depósito de documentos de la FAO 2013 [acceso 20 de junio de 2013]; Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/x2570s/X2570S10.htm>
16. Barbera C. Pesticidas agrícolas. Ediciones omega S.A. Editorial España; 1974.
17. Fernandez N, Pujol E, Maher E. Los plaguicidas aquí y ahora. Ministerio de Educación de Buenos Aires. Argentina, 2012.
18. Sánchez MJ. Los *plaguicidas*. Adsorción y evolución en el suelo. Ceres net [Revista en internet]* 1ª edición 1984 [acceso 23 de mayo de 2013]; 6 (1). Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>
19. Restrepo R. Paratión. [Monografía en internet]*, Lima, 2001 [acceso 24 de junio de 2013]; v (14) Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos14/paration/paration.shtml#ixzz2Wn>
20. Plaguicidas. [Sede web]* Asociación química de argentina 2009 [acceso 11 de julio de 2013]; 10(2). Disponible en: http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/seminarios/parte_2/plaguicidas.html
21. González O. Biorremediación de agua contaminada con paratión y cobre a través de tres organismos acuático. [tesis doctoral] México: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa; 2003.
22. Fieser L. y Fieser M.; Química Orgánica superior. Volumen 2. Reinhold Publishing CO, New York; 1962.
23. Alcaraz F. Disminución del contenido en *p*-nitrofenol de disoluciones acuosas mediante membranas líquidas en emulsión utilizando un mecanismo de transporte facilitado tipo I [tesis doctoral] Cartagena: Editorial científico, Universidad politécnica de Cartagena; 2009.
24. Silva Vargas M. Preconcentración selectiva de fenoles contaminantes prioritarios y determinación por espectrofotometría ultravioleta-visible, cromatografía líquida de alta eficacia y cromatografía de gases y espectrofotometría de masas [tesis doctoral]. Madrid: Ciudad Universitaria, Universidad Complutense de Madrid; 2000.
25. *P*-Nitrofenol [Internet]* MSDS de Merck Certificado de análisis (CoA) de Merck [acceso 27 de octubre de 2011]; disponible en: http://www.merckmillipore.com/peru/chemicals/4-nitrofenol/MDA-CHEM-106798/p_ghGb.s1L_mIAAAEWs.EfVhTl
26. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades [Internet]* Atlanta, GA 30333. 2009 diciembre [acceso 20 de mayo de 2013]; Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts50.html
27. Aguado JA. Problemática medioambiental de los fenoles sustituidos (I) [Revista en internet]* 20 febrero, 2009 [acceso 12 de junio de 2013]; 6 (3). Disponible en: <http://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2009/02/20/113222>
28. Méndez DF, Díaz F. Higiene industrial: manual para la formación del especialista [Libro en internet]* 2009 [acceso 20 de julio de 2013]; [extensión de pág. 476]*** Disponible en: <http://www.books.google.com.pe/books?isbn=8498980763>
29. Rodolfo GD. Degradación de compuestos nitroaromáticos por Rhodobacter: Purificación de la nitrorreductasa NprB. [Monografía en internet]* España. Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010 [acceso 20 de julio de 2013]; 170 (12) [extensión de pág. 12-23]*** Disponible en:

- <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/2746/9788469293867.pdf?sequence=1>
30. Cho YG, Rhee Y, Lee S. Influence of phenol on biodegradation of p-nitrophenol Bhy Freely suspended and immobilized Nocardiodessp [Monografía en internet]* Biop deg. 2000. [acceso 07 de octubre de 2010]; vol (11) Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401002925>
 31. Castillo RF. Biotecnología ambiental. [Libro en internet]* Tebar 2000 [acceso 18 de julio de 2013]; 614 (491) [extensión de pág. 494-497]***Disponible en: <http://www.books.google.com.pe/books?isbn=8473602110>
 32. Vega JM. Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la fisiología a la biología molecular : IV Reunión Nacional, Marbella, 1997 [Libro en internet]* universidad de Sevilla servicio de publicaciones,2006 [acceso 1 de julio de 2013]; 584 (58) [extensión de pág. 58-64]***Disponible en: <http://www.books.google.com.pe/books?isbn=8447204022>
 33. Koneman E, Stephen A. Diagnostico microbiológico texto y atlas en color, 6ta edición, Editorial Médica panamericana; 2008.
 34. Collins C y Lien P. "Metodos Microbiologicos." Editorial Acribia.S.A impreso en Zaragoza-España. 1989.
 35. Céspedes B. Proyecto de Mejoramiento del jr. Andres Avelino Cáceres (cuadra 02, 03 y 04), jr. C. Mendoza (cuadra 02 y 03), jr. R. Gutierrez (cuadra 02, 03 y 04), jr. 1 (cuadra 02) y jr. Alejandro Villantoy (cuadra 03) en el Centro Poblado de Mayapo, Distrito de LLochegua – Huanta – Ayacucho" [Monografía en internet]*, Ayacucho; 2010 [acceso 20 de mayo de 2013]; Disponible en: http://ofi.mef.gob.pe/appfd/hoja/visordocs.aspx?file_name=10022_opimdlloch e_2012221_183656.pdf
 36. Comisión Nacional para el desarrollo y vida sin drogas (DEVIDA). Gerencia de medio ambiente. Lima; 2010.
 37. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNDOC). Informe analítico de la problemática ambiental y la utilización de agroquímicos en la producción de la hoja de coca. [Revista en internet]* 2010 octubre [acceso 24 de julio de 2013]; 4 (1). Disponible en: http://www.unodc.org/documents/peruandecuador//Informes/Informes-Analiticos/Informe_Analitico_Agroquimicos.pdf.
 38. Servicio Nacional de Sanidad Agraria Peru (SENASA).Informe técnico general de actividades del año 2011. SENASA vegetal.Ayacucho.
 39. Zahidi B, Murakami Y, Alexander M. Factor limiting Success of inoculation to enhance biodegradation. Environ Sci. technol.1988 V(22).
 40. Wiggins B, Alexander M. Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation; 1988 v(54).
 41. Madigan M, Martinko j, Parker J, Broock. Biología de los microorganismos. 8^{va} Edición. Pretice Hall. Madrid; 1999.
 42. Mapa referencial. Instituto Nacional de Estadística e informática de Ayacucho.Municipalidad Distrital de Llochegua – Huanta – Ayacucho Disponible:http://www.peru.gob.pe/Nuevo_Portal_Municipal/portales/Municipalidades/473/entidad/PM_MUNICIPALIDAD_DETALLE.asp?pk_id_entidad=473&pk_id_tema=63995&pk_id_sub_tema=6012.
 43. Mapa de los ríos Apurimac y Ene-VRAE (Mapa topográfico) Lima.2013.Disponible: <http://www.caretas.com.pe/Modules/IBZoom.asp?ID=21191&T=4>.

44. Bin. C. W. El estudio de biorremediación de metales pesados del agua de mar cultivados por *Sphingomonas sp. XJ2* inmovilizado. Strain [revista en línea]* Octubre del 2011. [acceso 20 de mayo de 2013]** 1436(347) [pág. 347-353]***. Disponible en: <http://www.scientific.net/AMR.347-353.1436>
45. Benavides J, Quintero G, Ostos O. Aislamiento e identificación de 10 cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados provenientes de una finca productora de cebolla en la laguna de Tota [tesis doctoral]. Colombia: Servicio de publicaciones e intercambio científico, Universidad de La Salle 2006. Acceso 11 de mayo de 2013. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=474706&indexSearch=ID>
46. García M. Manual de laboratorio. Edit. MAD.S.L .Segunda edición España; 2003.
47. Atlas R, Bartha R. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4^{ta} Edición. Pearson Educación S.A. Impreso en España; 2002.
48. Ballardo C. Evaluación de la actividad degradativa y emulsificantes sobre hidrocarburos por bacterias aisladas de una planta de tratamiento de crudos". Lima-Perú. Programa y Libro resúmenes de XVIII Congreso Nacional de Biología de 24 al 29 de Octubre de 2010 Ayacucho- Perú.

ANEXOS

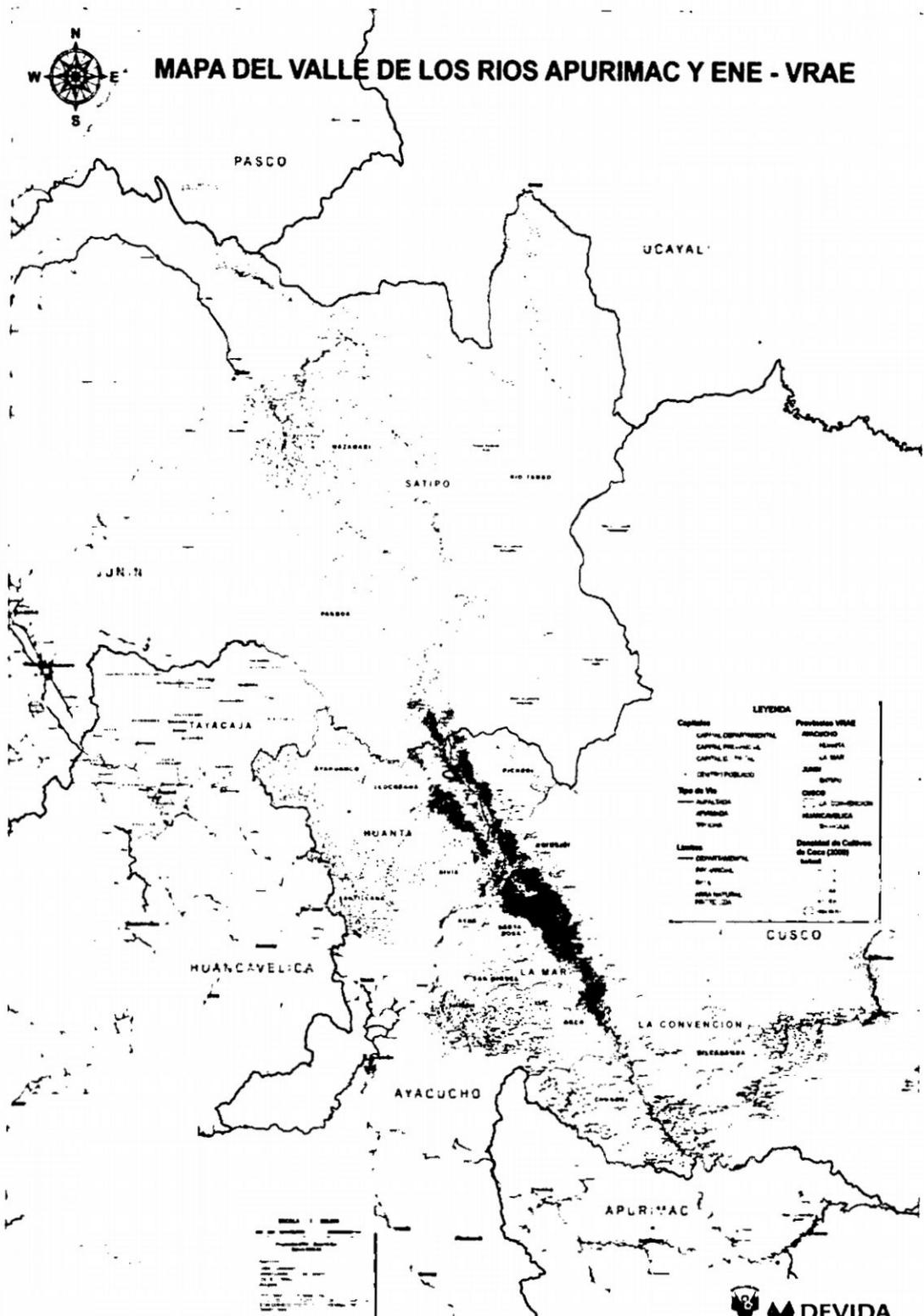


Figura 14. Densidad de los cultivos de coca en el VRAEM

(Mapa topográfico) ⁴³

Anexo 2

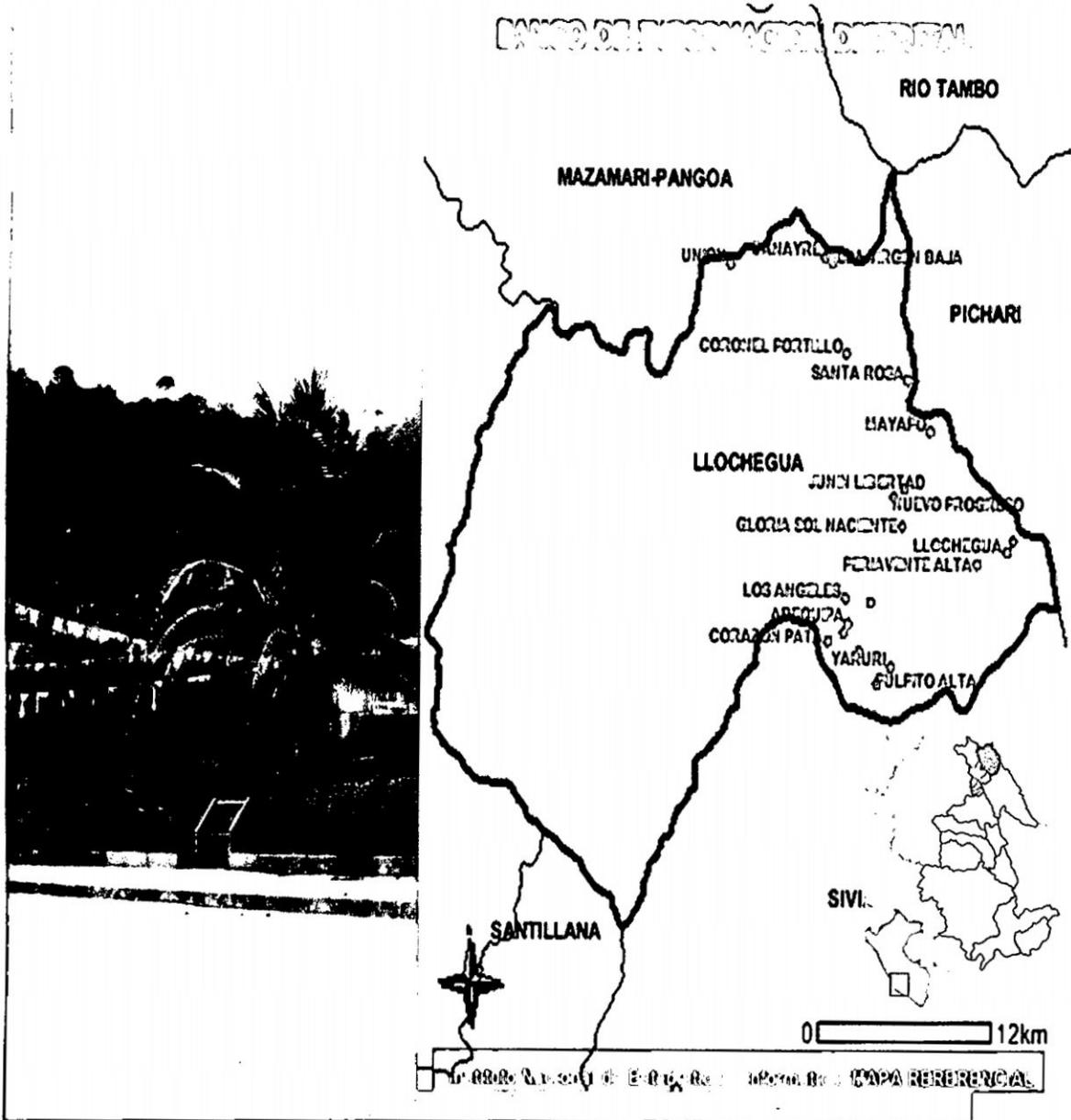


Figura 15. Mapa de la localidad del Centro Poblado de Mayapo de donde se obtuvieron las muestras de suelos de cultivo de coca⁴².

Anexo 3



Figura 16. Obtención de muestras de suelos de cultivo de coca del Centro Poblado de Mayapo.

Anexo 4

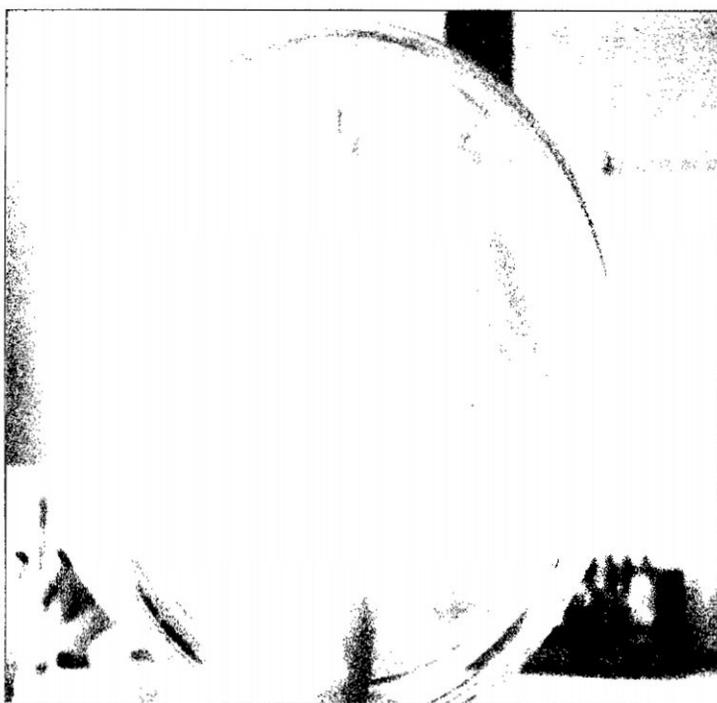


Figura 17. Crecimiento de las colonias sobre agar Busnell Hass suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol aisladas de la muestra de suelo1

Anexo 5



Figura 18. Crecimiento de las colonias sobre agar Busnell Hass suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol aisladas de la muestra de suelo 2

Anexo 6



Figura 19. Crecimiento de las colonias sobre agar Busnell Hass suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol aisladas de la muestra de suelo3.

Anexo 7



a) Cepas de consorcio 1 b) Cepas de consorcio 2 c) Cepas de Consorcio 3

Figura 20. Conservación de cepas

Anexo 8



Figura 21. Frascos cultivados conteniendo medio mineral Busnell Hass suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol se evidencia el crecimiento microbiano por la ausencia del color amarillo del *p*-nitrofenol

Anexo 9

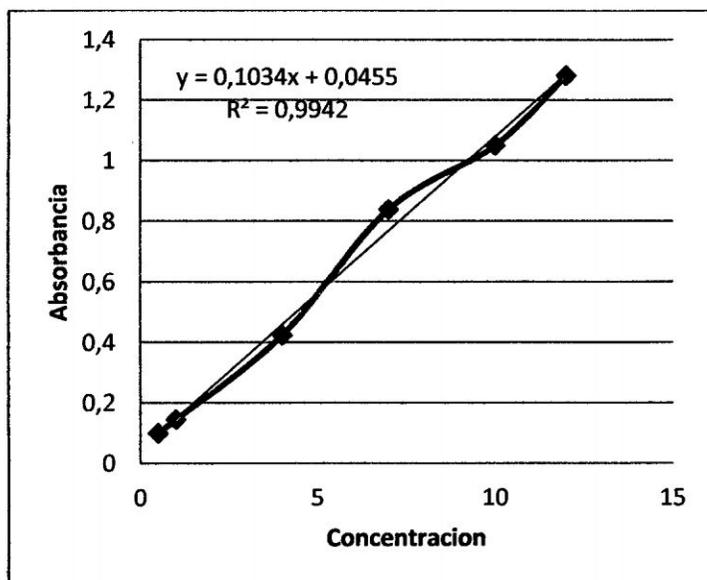


Figura 22. Curva patrón para medir la concentración de *p*-nitrofenol

Anexo 10

Tabla 11. Valores de la lectura en absorbancia de *p*-nitrofenol obtenidas durante el ensayo de la biodegradación de consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo.

Concentración de 12 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol					
Tiempo	Blanco	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3	
0 horas	1,318	1,318	1,338	1,316	
	1,318	1,326	1,329	1,308	
	1,318	1,335	1,320	1,301	
	1,311	1,169	1,167	1,150	
12 horas	1,311	1,179	1,148	1,146	
	1,311	1,189	1,129	1,143	
	1,308	1,028	1,125	1,020	
	1,308	1,077	1,103	0,931	
24 horas	1,308	1,127	1,081	0,842	
	1,305	0,832	0,894	0,890	
	1,305	0,881	0,897	0,744	
	1,305	0,930	0,901	0,658	
36 horas	1,295	0,623	0,715	0,410	
	1,295	0,726	0,717	0,332	
	1,295	0,830	0,720	0,375	
	1,292	0,547	0,399	0,290	
60 horas	1,292	0,613	0,403	0,265	
	1,292	0,679	0,408	0,240	
	1,274	0,469	0,328	0,098	
	1,274	0,434	0,317	0,074	
72 horas	1,274	0,399	0,307	0,050	
	Concentración de 10 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol				
	Tiempo	Blanco	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3
	0 horas	1,200	1,181	1,167	1,178
1,200		1,180	1,165	1,175	
1,200		1,178	1,164	1,172	
1,180		1,043	1,038	1,018	
12 horas	1,180	1,062	1,033	1,027	
	1,180	1,082	1,029	1,037	
	1,178	0,873	0,980	0,944	
	1,178	0,903	0,986	0,960	
24 horas	1,178	0,934	0,992	0,976	
	1,178	0,830	0,932	0,836	
	1,178	0,803	0,937	0,775	
	1,178	0,776	0,942	0,715	
36 horas	1,176	0,813	0,722	0,436	
	1,176	0,791	0,750	0,393	
	1,176	0,770	0,779	0,351	
	1,176	0,390	0,545	0,250	
60 horas	1,176	0,370	0,583	0,220	
	1,176	0,350	0,621	0,190	
	1,173	0,350	0,300	0,190	
	1,173	0,370	0,330	0,220	
72 horas	1,173	0,391	0,360	0,250	
	Concentración de 7 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol				
	Tiempo	Blanco	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3
	0 horas	0,830	0,778	0,829	0,823
0,830		0,790	0,831	0,821	
0,830		0,792	0,832	0,819	
0,825		0,625	0,735	0,639	
12 horas	0,825	0,610	0,709	0,643	
	0,825	0,596	0,684	0,647	
	0,820	0,337	0,655	0,325	
	0,820	0,369	0,617	0,334	
24 horas	0,820	0,402	0,580	0,343	
	0,816	0,253	0,386	0,213	
	0,816	0,303	0,383	0,205	
	0,816	0,353	0,380	0,197	
36 horas	0,816	0,01	0,03	0,01	
	0,816	0,05	0,01	0,02	
	0,816	0,03	0,01	0,01	
	Concentración de 4 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol				
Tiempo	Blanco	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3	
0 horas	0,430	0,431	0,431	0,427	
	0,430	0,430	0,429	0,424	
	0,430	0,427	0,426	0,420	
	0,429	0,335	0,370	0,360	
12 horas	0,429	0,346	0,372	0,357	
	0,429	0,358	0,373	0,354	
	0,426	0,015	0,060	0,01	
	0,426	0,01	0,057	0,01	
24 horas	0,426	0,01	0,055	0,01	
	0,426	0,01	0,055	0,01	

Anexo 11

Tabla 12. Valores de la lectura en concentraciones de *p*-nitrofenol obtenidas durante el ensayo de la biodegradación de consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo.

Concentración de 12 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol				
Tiempo	Blanco	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3
0 horas	12,30	12,30	12,50	12,29
	12,30	12,38	12,41	12,21
	12,30	12,47	12,32	12,14
12 horas	12,23	10,87	10,85	10,68
	12,23	10,96	10,66	10,65
	12,23	11,06	10,48	10,61
24 horas	12,21	9,50	10,44	9,42
	12,21	9,98	10,23	8,56
	12,21	10,46	10,01	7,70
36 horas	12,18	7,61	8,21	8,17
	12,18	8,08	8,24	7,05
	12,18	8,55	8,27	5,92
48 horas	12,08	5,59	6,47	3,53
	12,08	6,59	6,50	3,36
	12,08	7,59	6,52	3,19
60 horas	12,05	4,85	3,42	2,36
	12,05	5,49	3,46	2,12
	12,05	6,13	3,51	1,88
72 horas	11,88	4,10	2,73	0,51
	11,88	3,76	2,63	0,28
	11,88	3,42	2,63	0,04

Concentración de 10 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol				
Tiempo	Blanco	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3
0 horas	11,17	10,98	10,85	10,95
	11,17	10,97	10,83	10,92
	11,17	10,95	10,82	10,89
12 horas	10,97	9,65	9,60	9,41
	10,97	9,92	9,56	9,50
	10,97	10,02	9,51	9,59
24 horas	10,95	8,00	9,04	8,69
	10,95	8,30	9,10	8,84
	10,95	8,59	9,15	9,00
36 horas	10,95	7,59	8,57	7,64
	10,95	7,33	8,62	7,06
	10,95	7,06	8,67	6,47
48 horas	10,93	7,42	6,54	3,78
	10,93	7,21	6,82	3,37
	10,93	7,01	7,09	2,95
60 horas	10,93	3,33	4,83	1,98
	10,93	3,14	5,20	1,69
	10,93	2,94	5,57	1,40
72 horas	10,90	2,94	2,46	1,40
	10,90	3,14	2,75	1,69
	10,90	3,34	3,04	1,98

Concentración de 7 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol				
Tiempo	Blanco	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3
0 horas	7,59	7,18	7,57	7,52
	7,59	7,20	7,59	7,50
	7,59	7,22	7,60	7,48
12 horas	7,52	5,60	6,67	5,74
	7,52	5,46	6,42	5,78
	7,52	5,32	6,18	5,82
24 horas	7,49	2,82	5,89	2,70
	7,49	3,13	5,53	2,79
	7,49	3,45	5,17	2,88
36 horas	7,45	2,00	3,29	1,62
	7,45	2,49	3,26	1,54
	7,45	2,97	3,24	1,46
48 horas	7,45	0,01	0,02	0,01
	7,45	0,05	0,01	0,02
	7,45	0,03	0,01	0,01

Concentración de 4 mg/L de <i>p</i> -nitrofenol				
Tiempo	Blanco	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3
0 horas	3,71	3,73	3,72	3,69
	3,71	3,71	3,70	3,66
	3,71	3,69	3,68	3,62
12 horas	3,70	2,80	3,02	3,04
	3,70	2,91	3,09	3,01
	3,70	3,02	3,17	2,98
24 horas	3,68	0,01	0,14	0,00
	3,68	0,02	0,12	0,01
	3,68	0,02	0,09	0,01

Anexo 12

Tabla 13. Valores de la lectura en absorbancia de *p*-nitrofenol obtenidas durante el ensayo de la biodegradación realizado por cepas bacterianas aislados de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo.

Código de cepas	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Blanco	1,295	1,293	1,290	1,288	1,286	1,280	1,28
1.1	1,290	1,289	1,279	1,271	1,253	1,249	1,245
1.3	1,240	1,227	1,221	1,219	1,214	1,213	1,205
1.4	1,298	1,290	1,283	1,257	1,242	1,240	1,24
1.5	1,293	1,291	1,285	1,280	1,260	1,255	1,253
2.3	1,290	1,277	1,257	1,250	1,245	1,227	1,226
2.10	1,276	1,268	1,253	1,237	1,225	1,220	1,217
2.11	1,268	1,249	1,245	1,237	1,236	1,218	1,218
2.18	1,261	1,254	1,240	1,237	1,264	1,246	1,240
3.1	1,290	1,287	1,287	1,278	1,243	1,240	1,238
3.5	1,288	1,283	1,268	1,259	1,252	1,225	1,220
3.6	1,279	1,277	1,266	1,263	1,252	1,238	1,238
3.21	1,295	1,285	1,269	1,260	1,253	1,238	1,200

Anexo 13

Tabla 14. Valores de la concentraciones de *p*-nitrofenol obtenidas durante el ensayo de la biodegradación realizado por cepas bacterianas aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo.

Código de cepas	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Blanco	12,136	12,177	12,087	12,068	12,040	11,99	11,99
1.1	12,087	12,078	11,981	11,903	11,728	11,689	11,650
1.3	11,621	11,476	11,417	11,398	11,350	11,340	11,262
1.4	12,165	12,087	12,019	11,767	11,620	11,600	11,600
1.5	12,117	12,097	12,039	11,942	11,796	11,750	11,730
2.3	12,087	11,961	11,767	11,699	11,650	11,476	11,463
2.10	11,950	11,874	11,728	11,650	11,641	11,544	11,495
2.11	11,874	11,689	11,650	11,573	11,456	11,408	11,379
2.18	11,800	11,738	11,602	11,573	11,563	11,388	11,388
3.1	12,087	12,058	12,058	11,971	11,867	11,660	11,600
3.5	12,068	12,019	11,874	11,786	11,631	11,602	11,583
3.6	11,981	11,961	11,854	11,825	11,718	11,456	11,450
3.21	12,136	12,039	11,883	11,796	11,728	11,583	11,553

Anexo 14

Tabla 15. Análisis de varianza de efectos principales para la biodegradación *p*-nitrofenol (mg/L) comparando un blanco y 3 consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" en 24 horas, a una concentración inicial de 4 mg/L de *p*-nitrofenol.

Variable dependiente: Concentración final *p*-nitrofenol (mg/L)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos (consorcios)	14,236	3	4,745	8,537	,000
Tiempo horas	50,849	2	25,425	45,738	,000
Error	16,676	30	,556		
Total	326,841	36			
Total corregida	81,762	35			

a. R cuadrado = ,796 (R cuadrado corregida = ,762)

Tabla 16. Análisis de varianza de efectos principales para la biodegradación *p*-nitrofenol (mg/L) comparando un blanco y 3 consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" en 48 horas, a una concentración inicial de 7 mg/L de *p*-nitrofenol.

Anexo 15

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos(consorcios)	145,333	3	48,444	35,902	,000
Tiempo (horas)	262,100	4	65,525	48,560	,000
Error	70,167	52	1,349		
Total	1860,000	60			
Total corregida	477,600	59			
a. R cuadrado = ,853 (R cuadrado corregida = ,833)					

Anexo 16

Tabla 17. Análisis de varianza de efectos principales para la biodegradación *p*-nitrofenol (mg/L) comparando un blanco y 3 consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" en 72 horas, a una concentración inicial de 10 mg/L de *p*-nitrofenol.

Origen	Suma de		Media	F	Sig.
	cuadrados tipo	gl			
	III				
Tratamientos (consorcios)	276,830	3	92,277	41,126	,000
Tiempo (horas)	414,249	6	69,042	30,771	,000
Error	166,037	74	2,244		
Total	6170,102	84			
Total corregida	857,117	83			

a. R cuadrado = ,806 (R cuadrado corregida = ,783)

Tabla 18. Test de Tukey para comparar la biodegradación de *p*-nitrofenol (mg/L) en un blanco y tres consorcios bacterianos a una concentración inicial de 10 mg/l de *p*-nitrofenol.

DHS de Tukey	Concentración final <i>p</i> -nitrofenol (mg/L)		
	Tratamientos	N	Subconjunto
			1 2 3
Consortio 3	21	6,1524	
Consortio 1	21	7,1348	7,1348
Consortio 2	21	7,5533	7,5533
Blanco	21	10,9714	10,9714
Sig.		,155	,802 1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 2,244.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 21,000
- b. Alfa = 0,05.

Anexo 18

Tabla 19. Análisis de varianza de efectos principales para la biodegradación *p*-nitrofenol (mg/L) comparando un blanco y 3 consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxyllum coca "coca"* en 72 horas a una concentración inicial de 12 mg/L de *p*-nitrofenol.

Variable dependiente: Concentración final <i>p</i> -nitrofenol (mg/L)						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Tratamientos (consorcios)	391,018	3	130,339	45,853	,000	
Tiempo (horas)	586,373	6	97,729	34,381	,000	
Error	210,348	74	2,843			
Total	7386,454	84				
Total corregida	1187,738	83				

a. R cuadrado = ,823 (R cuadrado corregida = ,801)

Anexo 19

Tabla 20. Test de Tukey para comparar la biodegradación de *p*-nitrofenol (mg/L) en un blanco y tres consorcios bacterianos a una concentración inicial de 12 mg/L de *p*-nitrofenol.

DHS de Tukey	N	Concentración final <i>p</i> -nitrofenol (mg/L)		
		1	2	3
Consorcio 3	21	6,3176		
Consorcio 2	21		7,7329	
Consorcio 1	21		8,1781	
Blanco	21			12,1329
Sig.		1,000	,827	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 2,843.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 21,000

b. Alfa = 0,05.

Anexo 20

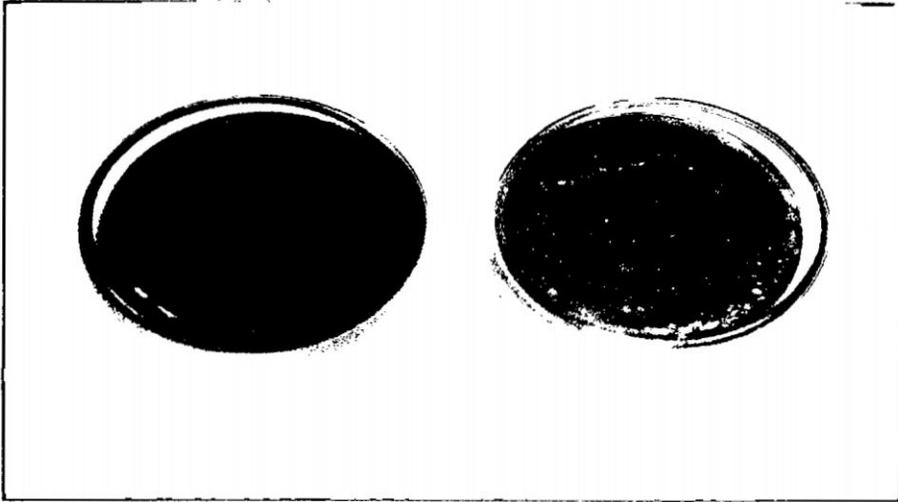


Figura 23. Crecimiento de las colonias amarillas sobre agar sangre

Anexo 21

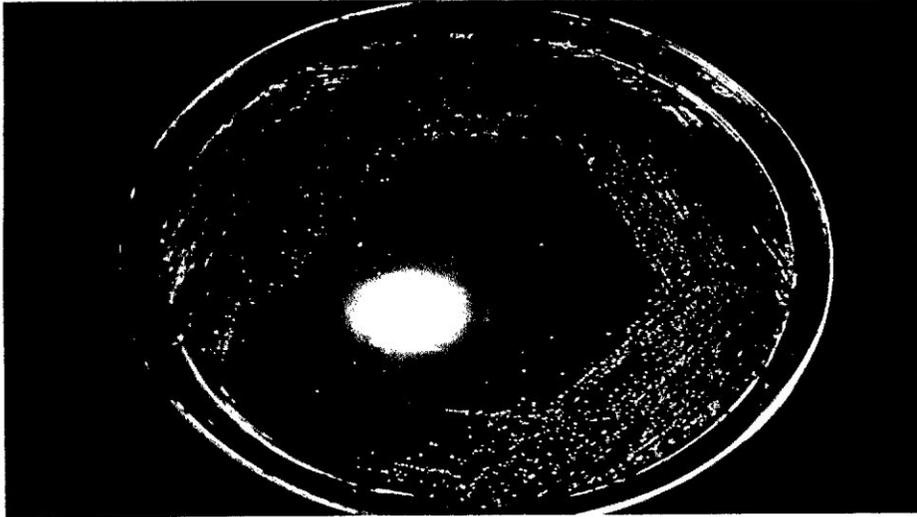


Figura 24. Crecimiento de colonias sobre agar MacConkey

BIBLIOTECA E INFORMACION
CULTURAL
U.N.S.C.H.

Anexo 22

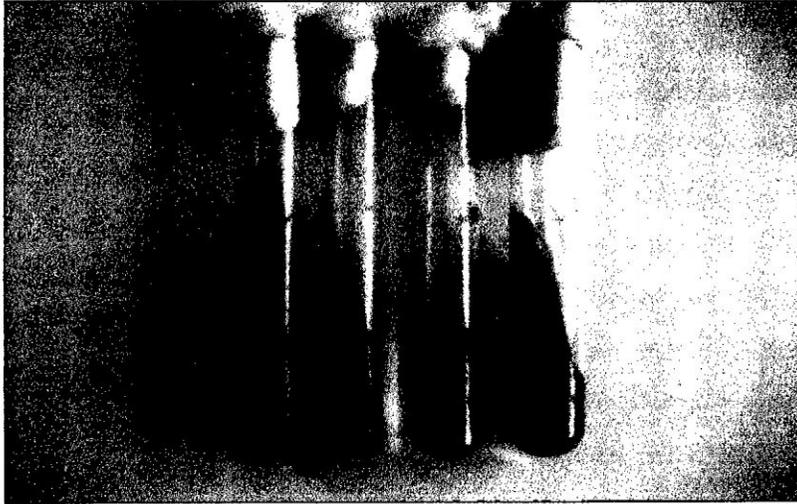


Figura 25. Pruebas bioquímicas de TSI, LIA, MIO, Urea

Anexo 23

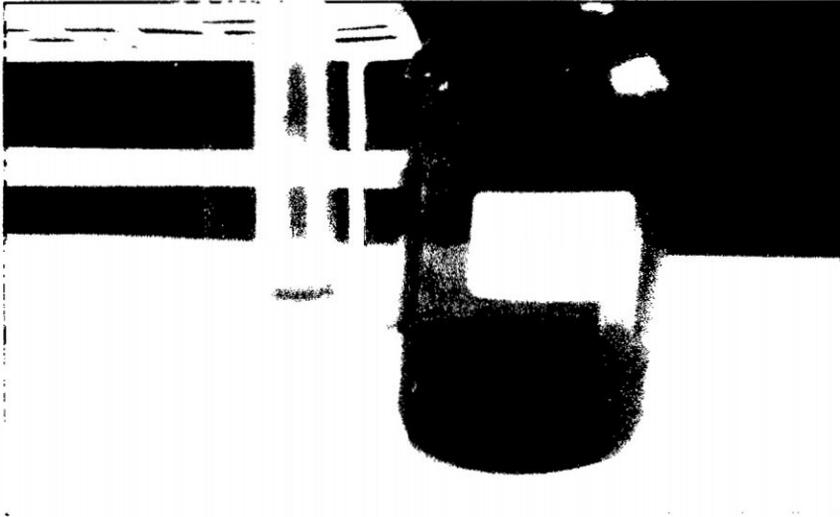


Figura 26. Medio MIO con resultado positivo y reactivo de Kovacs

Tabla 21. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Identificación de bacterias degradadoras aisladas de suelos de cultivo de <i>Erythroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de provincia de Huanta. Ayacucho. 2012	¿ Qué géneros de bacterias degradadoras de p-nitrofenol aislados de suelos de cultivo de <i>Erythroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de provincia de Huanta. 2012	<p>Objetivo general:</p> <p>Identificar los géneros de bacterias degradadoras de p-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de <i>Erythroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de provincia de Huanta. Ayacucho.</p> <p>Objetivo específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los géneros de bacterias degradadoras de p-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de <i>Erythroxylum coca</i> "coca" del Centro Poblado de provincia de Huanta. 	<p>1.2 Antecedentes</p> <p>1.3.1 suelo</p> <p>1.3.compuesto nitroaromaticos</p> <p>1.3.4 p-nitrofenol</p> <p>1.3.5 contaminación.</p> <p>1.3.6 características de los géneros de bacterias degradadoras de p-nitrofenol</p>	<p>Los géneros de bacterias degradadoras de p-nitrofenol son flavobacterium pseudomonas moraxella, artrobacter y bacillus</p>	<p>2.1.1 Variable independiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Suelos agrícolas <p>2.1.2 Variable dependiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Bacterias degradadoras de p-nitrofenol Tipo de cultivo 	<p>Tipo de investigación</p> <p>Básica</p> <p>Nivel de investigación</p> <p>Descriptiva</p> <p>Diseño</p> <p>transversal</p> <p>Población</p> <p>Suelos agrícolas en Valle Rio Apurimac y Ene</p> <p>Muestra</p> <p>Campos de cultivo contaminados</p>

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE *p*-NITROFENOL AISLADAS DE SUELOS DE CULTIVO DE *Erythroxylum coca* “COCA” DEL CENTRO POBLADO DE MAYAPO PROVINCIA DE HUANTA. AYACUCHO 2012

Rocío Del Pilar, Osejo Pacheco.¹, Saúl A. chuchón M.¹

¹Biología: UNSCH

RESUMEN

En la actualidad el aumento del uso de pesticidas en la actividad agrícola ha generado la acumulación de grandes cantidades de compuestos tóxicos, uno de estos es el *p*-nitrofenol, cuya concentración se incrementa como consecuencia directa del uso de pesticidas en la agricultura. La presente investigación tiene como objetivo general identificar los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* “coca” del Centro Poblado de Mayapo, provincia de Huanta - Ayacucho. La investigación es de tipo básica, nivel descriptivo, diseño transversal. El estudio se realizó con tres unidades de muestra tomadas de tres terrenos de cultivo de *Erythroxylum coca* “coca” del Centro Poblado de Mayapo por un método no probabilístico. A partir de tales muestras se procedió al aislamiento de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol utilizando el medio mineral Busnell Hass suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol, las colonias fueron purificadas en agar nutritivo y conservadas como cepario. A partir de estas se obtuvieron 3 consorcios, con las 12 cepas aisladas de cada terreno. La evaluación de la capacidad biodegradadora del *p*-nitrofenol se realizó con tratamientos de 4, 7, 10, 12 mg/L por un periodo de 72 horas. La concentración de *p*-nitrofenol y determinación del mismo, se realizó utilizando el espectrofotómetro “espectrofotometer 1200” serie ÚNICO haciendo lecturas a 380 nm de longitud de onda. La identificación de las cepas bacterianas se realizó mediante las pruebas bioquímicas: oxidasa, TSI, LIA, motilidad y ureasa. Las cepas aisladas con capacidad degradadora de *p*-nitrofenol pertenecen a los géneros *Sphingomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.*

Palabras clave: degradación, *p*-nitrofenol, insecticidas, *Erythroxylum coca*.

SUMMARY

Today, the increased use of pesticides in agriculture has led to the accumulation of large amounts of toxic compounds, one of which is the *p*-nitrophenol, whose concentration increases as a direct result of pesticide use in agriculture. This research has the overall objective to identify genres degrading bacteria isolated *p*-nitrophenol soil culture *Erythroxylum Coca* "Coca" of the Town Center Mayapo province of Huanta - Ayacucho. Research is basic, descriptive level, cross-sectional design. The study was conducted with three sample units taken from three farmlands of *Erythroxylum Coca* "Coca" Poblado Mayapo Center for non-probabilistic method. From these samples, the isolation of bacteria degrading *p*-nitrophenol using mineral medium Hass Busnell supplemented with 10 mg / L of *p*-nitrophenol, colonies were purified on nutrient agar and stored as strain collection. From these three pools were obtained, with 12 of each field isolates. The evaluation of the biodegrading capacity of *p*-nitrophenol was performed with treatments 4, 7, 10, 12 mg / L for a period of 72 hours. The concentration of *p*-nitrophenol and determination thereof is performed using the spectrophotometer "espectrofotometer 1200" unique serial making readings at 380 nm wavelength. Identification of the bacterial strains was determined by biochemical tests: oxidase, TSI, LIA, motility and urease. Isolates with degrading capacity of *p*-nitrophenol belonging to the genera *Sphingomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* and *Acinetobacter sp.*

Key words: degradation, *p*-nitrophenol, insecticides, *Erythroxylum coca*.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el aumento del uso de pesticidas en la actividad agrícola ha generado grandes cantidades de compuestos tóxicos. Estos compuestos han sido liberados al ambiente causando una extensa contaminación de suelos y cuerpos de agua¹. Uno de estos compuestos tóxicos puede ser el *p*-nitrofenol, cuya concentración se incrementa como consecuencia directa del uso de pesticidas en la agricultura. El *p*-nitrofenol puede acumularse en el suelo como resultado de la hidrólisis de varios insecticidas organofosforados y herbicidas nitrofenólicos, además puede entrar al ambiente durante la elaboración de tintes, pesticidas y medicamentos². El problema fundamental por el cual pasa el Centro Poblado de Mayapo, jurisdicción del Distrito de LLochegua ubicada en la Provincia de Huanta, Departamento de Ayacucho es la contaminación de suelos por el uso frecuente de pesticidas y fertilizantes que utilizan los pobladores.

Con el fin de incrementar y mejorar la producción de la hoja de coca se ha venido masificando el uso de agroquímicos para estos cultivos. La falta de conocimiento de los productores cocaleros, que no miden las consecuencias ambientales al usar grandes cantidades de productos agroquímicos, al ser utilizados persisten en un tiempo y compuestos tóxicos como el *p*-nitrofenol pueden acumularse en el suelo agrícola. Por factores climáticos, estos compuestos discurren a los cursos de agua, afectando la biodiversidad y a la población por consumir el agua y los alimentos, ocasionando enfermedades y mortandad por acumulación de toxinas³.

Debido a la alta toxicidad de este compuesto, una alternativa atractiva para disminuir la concentración de *p*-nitrofenol es la biodegradación, motivo por el cual se realiza el presente trabajo de investigación de tipo básica, nivel descriptivo, diseño transversal en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga con los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Identificar los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo, provincia de Huanta, Ayacucho.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los géneros de las bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de

suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca".

- Medir la capacidad degradadora de *p*-nitrofenol por parte de bacterias aisladas de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo, Provincia de Huanta, Ayacucho.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de puntos de muestreo de suelos de cultivo de coca

Las muestras de suelo de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" fueron recolectadas en el Centro Poblado de Mayapo, jurisdicción del Distrito de LLochegua ubicada en la Provincia de Huanta, Departamento de Ayacucho, que se encuentra en una altitud promedio de 503 msnm, con una temperatura promedio de 24 °C, el suelo está conformado de una estructura limosa de granos finos³⁵. El muestreo se realizó en octubre de 2011 en un periodo de dos días.

3.2. Muestra y sistema de muestreo

- El estudio se realizó con 3 unidades de muestra, cada uno conteniendo aproximadamente 2 kg de tierras de cultivo de coca, tomadas de tres terrenos con cultivo de *Erithroxylum coca* "coca". Luego de seleccionar el terreno se procedió a muestrear a través de sub muestreos cuyos puntos fueron distribuidos de manera equitativa en todo el terreno, fueron tomadas por conveniencia.
- Los criterios de inclusión para tomar las muestras fueron: zona de mayor producción de *Erithroxylum coca* "coca"³⁶, ubicación geográfica de mayor uso de agroquímicos^{37, 38} y edad del cultivo.

3.3. Métodos para la recolección de datos

3.3.1. Obtención de muestras

- Una vez definidas los puntos de sub muestreos (10 distribuidos en todo el terreno) se procedió al muestreo según los siguientes pasos:
- Se retiró la capa superficial de tierra de unos 10 a 15 cm, con ayuda de una paleta desinfectada.
- Se tomó aproximadamente 200 g de suelo, entre los 10 y 15 cm de profundidad, luego se introdujeron en una bolsa de polietileno nueva, obteniéndose finalmente una muestra de aproximadamente 2 kg.

- Las bolsas conteniendo las muestras fueron colocadas en “cooler” luego transportadas a una temperatura ambiente, por un periodo de tres días al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para su respectivo procesamiento.

3.3.2. Aislamiento de microorganismos degradadores de *p*-nitrofenol

- En condiciones asépticas se tamizó la muestra de suelo recolectada de los cultivos de coca, con malla de 2 x 2 mm de porosidad para separar las piedras y partículas grandes.
- Se pesó 10 g de suelo tamizado, se diluyó en 90 mL de agua peptonada, luego se agitó por 5 a 10 minutos y se dejó decantar.
- 10 mL del sobrenadante fue inoculado en frascos conteniendo 90 mL del medio mineral Busnell Hass, suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol.
- Los frascos conteniendo los cultivos fueron protegidos con papel aluminio, incubados a temperatura ambiente en agitación \pm 200 RPM por 8 días.
- Transcurrido el tiempo se evidenció el crecimiento microbiano por turbidez y la degradación del *p*-nitrofenol por la desaparición del color amarillo en el medio mineral suplementado con *p*-nitrofenol inicialmente.
- Enseguida se procedió al aislamiento de las bacterias en medio agar Busnell Hass suplementado con 10 mg/L de *p*-nitrofenol por la técnica de diseminación.
- Las placas fueron incubadas a 30 °C por 48 horas en posición invertida.
- Una vez obtenidas las colonias éstas fueron sembradas en otras placas conteniendo agar nutritivo, por la técnica de agotamiento en superficie. Para lograr una mayor purificación. Las colonias obtenidas fueron repicadas en viales y conservadas como cepario.
- Se obtuvo consorcios, con las cepas aisladas de muestras de cada terreno (3 consorcios).

3.3.3 Cálculo de la concentración de *p*-nitrofenol mediante curva patrón

- Se prepararon 100 mL de soluciones de *p*-nitrofenol a las siguientes concentraciones: 0,5, 1, 4, 10, 12 mg/L utilizando agua destilada como diluyente.
- Se transfirieron 10 mL de cada concentración en tubos de ensayo 16 mm x 150 mm.
- Luego se prosiguió a realizar la lectura con luz de 380 nm de longitud de onda con el espectrofotómetro “espectrofotometer 1200” serie ÚNICO, usando como blanco agua destilada.
- Con los valores obtenidos se prosiguió a determinar la curva patrón.

3.3.4. Evaluación de la capacidad biodegradativa de *p*-nitrofenol.

a) Preparación del inóculo

- Las cepas de cada consorcio fueron cultivadas en tubos conteniendo 10 mL de caldo nutritivo incubados a 30°C por 48 horas; luego estos cultivos fueron mezclados en un matraz de 250 mL; obteniéndose 3 matraces conteniendo cada uno 1 consorcio.

b) Medición de la concentración de la capacidad biodegradadora de

p-nitrofenol

- Del matraz se tomó 1mL del inóculo y se inocularon a frascos conteniendo 100 mL de caldo Busnell Hass, suplementado con *p*-nitrofenol a diferentes concentraciones de 4, 7, 10, 12 mg/L, respectivamente, con tres repeticiones en cada caso. Se empleó el diseño experimental factorial
- Paralelamente se prepararon otros frascos con 100mL de caldo Busnell Hass, suplementado con *p*-nitrofenol a diferentes concentraciones de 4, 7, 10, 12 mg/L a los cuales no se inoculó el consorcio microbiano (ensayo blanco).
- Todos los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente en constante agitación \pm 200 RPM durante 8 días.

- A partir de la hora cero, cada 12 horas se determinó la concentración de *p*-nitrofenol de cada uno de los frascos de ensayo.
- Se tomó en un tubo de ensayo de 16 mm x 150 mm, 5 mL de cultivo Busnell Hass suplementado con *p*-nitrofenol de diferentes concentraciones.
- Se agregó unas gotas de NaOH (1N) para ajustar el pH a 9.
- Luego se centrifugó a 3600 rpm por 15 minutos para separar el sedimento de la muestra que podría inferir en la lectura en el espectrofotómetro.
- Luego se prosiguió a realizar la lectura a 380 nm con el espectrofotómetro "espectrofotometer 1200" serie ÚNICO, previamente usando como blanco agua destilada.
- Con los valores de la lectura se determinó la cantidad de *p*-nitrofenol, de acuerdo a la ecuación y gráfico de la curva patrón.

3.3.5. Identificación de cepas degradadoras de *p*-nitrofenol

a) Morfología de las colonias. Las bacterias aisladas se han caracterizado y diferenciado según las características culturales como: forma, borde, elevación, textura y color de las colonias. Juntamente con la descripción macroscópica se realizó la caracterización microscópica mediante la coloración Gram y su morfología.

b) Identificación bioquímica de géneros. Para identificar bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol se realizó la verificación de crecimiento en agar MacConkey y agar sangre y las pruebas bioquímicas de: oxidasa, TSI, LIA, motilidad y urea.

3.3.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos en los procedimientos anteriores fueron presentados en tablas e histogramas. Se realizó análisis de estadística descriptiva inferencial como fue el análisis de varianza con un 95% de confianza utilizando software SPSS Statistics 20 y Excel 2010.

V. RESULTADOS

Tabla 7. Características culturales de cepas bacterianas degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho. 2012

Nº	Código de cepas	Características culturales	Morfología	Gram
1	1.1	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color transparente de consistencia seca	Bacilos	-
2	1.3	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-
3	1.4	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color transparente de consistencia seca	Bacilos	-
4	1.5	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color transparente de consistencia seca	Bacilos	-
5	2.10	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-
6	2.3	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-
7	2.18	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-
8	3.1	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color transparente de consistencia seca	Bacilos	-
9	3.2	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color amarillo consistencia fresca	Bacilos	-
10	3.5	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color amarillo consistencia fresca	Bacilos	-
11	3.6	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color amarillo consistencia fresca	Bacilos	-
12	3.21	Colonias de forma circular de borde entero con elevación plana, color blanco lechoso, consistencia fresca	Bacilos	-

Tabla N° 08. Resultados de pruebas bioquímicas de identificación de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de coca *Erythroxylum coca* del Centro Poblado de Mayapo Ayacucho 2012.

N°	Características	Cepa 1.1	Cepa 1.4	Cepa 1.5	Cepa 3.1	Cepa 1.3	Cepa 2.3	Cepa 2.1	Cepa 2.18	Cepa 3.21	Cepa 3.2	Cepa 3.18	Cepa 3.6
1	Tinción Gram	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)
2	Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
3	Crecimiento MacConkey	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4	Crecimiento Agar Sangre	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	TSI	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
6	LIA	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
8	UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Oxidasa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
10	SIM Movilidad	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
11	Género	<i>Alcaligenes sp.</i>				<i>Acinetobacter sp.</i>				<i>Sphingomonas sp.</i>			

Tabla 9. Géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de coca *Erythroxylum coca* del Centro Poblado de Mayapo. Ayacucho 2012.

código	consorcio 1	código	Consorcio 2	código	Consorcio 3
1.1	<i>Alcaligenes sp.</i>	2.10	<i>Acinetobacter sp.</i>	3.1	<i>Alcaligenes sp.</i>
1.3	<i>Acinetobacter sp.</i>	2.3	<i>Acinetobacter sp.</i>	3.2	<i>Sphingomonas sp.</i>
1.4	<i>Alcaligenes sp.</i>	2.18	<i>Acinetobacter sp.</i>	3.5	<i>Sphingomonas sp.</i>
1.5	<i>Alcaligenes sp.</i>			3.6	<i>Sphingomonas sp.</i>
				3.21	<i>Acinetobacter sp.</i>

Tabla 10. Porcentaje de los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo. Ayacucho 2012.

Géneros	N°	%
<i>Acinetobacter</i>	5	42%
<i>Alcaligenes</i>	4	33%
<i>Sphingomonas</i>	3	25%
Total	12	100%

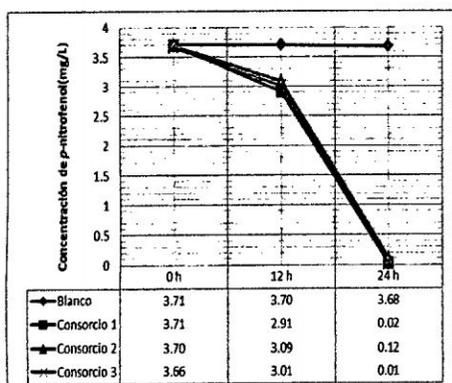


Figura 7. Biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 4 mg/L según horas transcurridas.

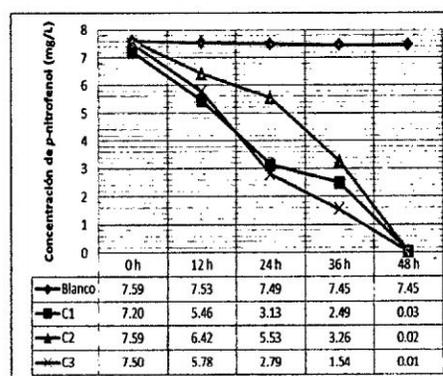


Figura 8. Biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 7 mg/L según horas transcurridas.

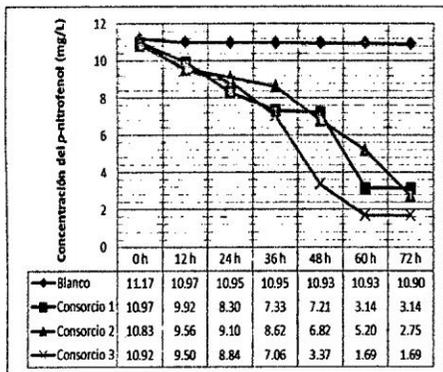


Figura 9. Biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxyllum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 10 mg/L según horas transcurridas.

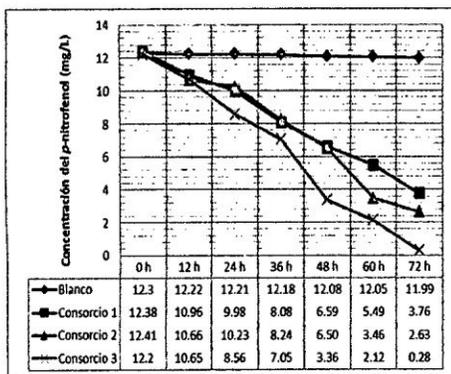


Figura 10. Biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxyllum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo a una concentración inicial de 2 mg/L según horas transcurridas.

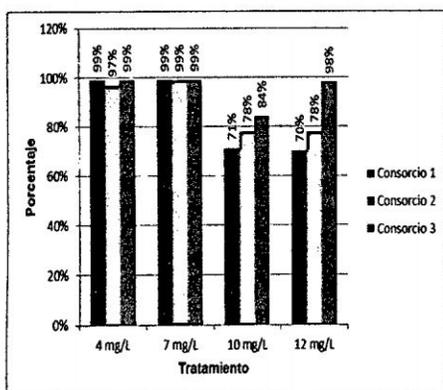


Figura 11. Porcentaje de biodegradación de *p*-nitrofenol por consorcios bacterianos aislados de suelos de cultivo de *Erithroxyllum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo, en relación a diferentes tratamientos

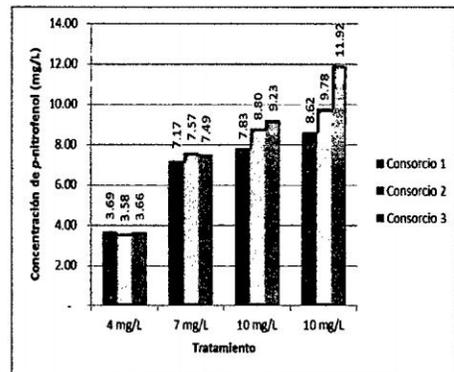


Figura 12. Cantidad total de *p*-nitrofenol degradado por consorcio microbiano en relación a diferentes tratamientos.

V. DISCUSIÓN

Es importante estudiar qué poblaciones microbianas existen en el suelo contaminado ya que estas probablemente ya se habrán adaptado al ambiente contaminado³⁶. En el Valle Rio Apurimac Ene y Mantaro analistas estiman, que anualmente se aplica alrededor 700 mil litros de agroquímicos a los cultivos de coca³⁴. En el Centro Poblado de Mayapo los agroquímicos más utilizados para la producción de hoja de coca son el Gramoxil, Gramoxone, Tamaron, Thiodan Caporal, Monitor, Paration entre otros productos altamente tóxicos³⁵.

Bajo este concepto se decidió extraer la muestra de suelo de cultivo de coca del Centro poblado de Mayapo para posteriormente aislar un consorcio microbiano para la degradación de *p*-nitrofenol. Bracho⁹, en el 2007 sostiene que una rápida degradación y un periodo corto de aclimatación puede relacionarse a que las comunidades microbianas han estado expuestas al contaminante de interés o compuestos con estructura similar. Los resultados obtenidos de la biodegradación del *p*-nitrofenol por consorcio microbiano aislados a partir de los suelos de cultivo de coca mostraron una rápida degradación de *p*-nitrofenol.

En la Figura 7, se muestran los valores de biodegradación de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 4 mg/L según las horas transcurridas. A las 24 horas del ensayo la concentración del *p*-nitrofenol es: 0,02; 0,12; 0,01 mg/L respectivamente realizado por el consorcio bacteriano C1, C2, C3, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano C1, C2, C3 ha logrado reducir 3,66; 3,58; 3,65 mg/L de *p*-nitrofenol respectivamente que equivale a 99 %, 97 %, 99 %, cada uno, respecto a la concentración inicial. Al realizar el análisis de varianza no se obtiene significancia estadística ($\alpha \leq 0,05$) entre los tres consorcios, lo

que se interpreta que los tres consorcios son iguales en la degradación del *p*-nitrofenol.

En la Figura 8, se muestran los valores de biodegradación de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 7 mg/L según las horas transcurridas. A las 48 horas del ensayo la concentración del *p*-nitrofenol es: 0,03; 0,02; 0,01 mg/L respectivamente realizado por el consorcio bacteriano C1, C2, C3, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano C1, C2, C3 ha logrado reducir 7,1; 7,5; 7,4 mg/L de *p*-nitrofenol respectivamente que equivale a 99 %, 99 %, 99 %, cada uno, respecto a la concentración inicial. Al realizar el análisis de varianza no se obtiene significancia estadística ($\alpha < 0,05$) entre los tres consorcios, lo que se interpreta que los tres consorcios son iguales en la degradación del *p*-nitrofenol.

En la Figura 9, se muestran los valores de biodegradación de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 10 mg/L según las horas transcurridas. A las 72 horas del ensayo la concentración del *p*-nitrofenol es : 3,14; 2,75; 1,16 mg/L respectivamente realizado por el consorcio bacteriano C1, C2, C3, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano C1, C2, C3 ha logrado reducir 7,83; 8,80; 9,23 mg/L de *p*-nitrofenol respectivamente que equivale a 71 %, 78 %, 84 %, cada uno, respecto a la concentración inicial. Al realizar el análisis de varianza se obtiene significancia estadística ($\alpha < 0,05$) entre los tres consorcios, por lo que se realizó la prueba de tukey donde el consorcio C3 es estadísticamente superior a los otros dos consorcio en la degradación del *p*-nitrofenol.

En la Figura 10, se muestran los valores de biodegradación de *p*-nitrofenol a una concentración inicial de 12 mg/L según las horas transcurridas. A las 72 horas del ensayo la concentración del *p*-nitrofenol es : 3,71; 2,63; 0,28 mg/L respectivamente realizado por el consorcio bacteriano C1, C2, C3, esto significa que la actividad biodegradadora del consorcio bacteriano C1, C2, C3 ha logrado reducir 8,62; 9,78; 11,92 mg/L de *p*-nitrofenol respectivamente que equivale a 70 %, 78 %, 98 %, cada uno, respecto a la concentración inicial. Al realizar el análisis de varianza se obtiene significancia estadística ($\alpha < 0,05$) entre los tres consorcios, por lo que se realizó la prueba de tukey donde el consorcio C3 es estadísticamente superior a los otros dos consorcio en la degradación del *p*-nitrofenol.

Es importante resaltar que la población microbiana degradadora fue más alta por el

consorcio bacteriano C3. Esto permite inferir que las poblaciones microbianas de las muestras de suelo estuvieron expuestas a mayor actividad antropogénica y al contaminante con más frecuencia y las dos muestras de suelos de donde se aislaron el consorcio bacteriano C1 y C2 están menos expuestos a este contaminante. Esto nos podría indicar que la poblaciones microbianas de la muestra de suelo de donde se aislaron el consorcio bacteriano C3 son mucho más eficientes en la remoción de *p*-nitrofenol que los consorcios bacterianos C1 y C2 aisladas de las otras muestras de suelo.

Bracho⁹, en el 2007, obtuvo 90 % de biodegradación del *p*-nitrofenol de una concentración inicial de 10 mg/L en 70 horas por efecto del consorcio microbiano de bacterias asociadas principalmente al género *Pseudomonas*. Asimismo en nuestra investigación el tiempo máximo para la degradación del *p*-nitrofenol a cargo del consorcio bacteriano según los tratamientos de diferentes concentraciones es: 24 horas para degradar una concentración de 4 mg/L; removiendo el compuesto en un 99 %, 97 %, 99 % realizado por el C1, C2 y C3 respectivamente; 36 horas para degradar una concentración de 7 mg/L; removiendo el compuesto en un 65 %, 51 %, 78 % realizado por el C1, C2 y C3 respectivamente; 72 horas para degradar una concentración de 10 mg/L y 12 mg/L; removiendo el compuesto en un 70 %, 78 %, 98 % realizado por el C1, C2 y C3 respectivamente. Estos resultados corroboran la eficiencia para metabolizar el compuesto *p*-nitrofenol realizado por los microorganismos en un tiempo máximo de horas coincidiendo que la concentración de 10 mg/L es degradado en un aproximado de 70 horas según el autor anteriormente mencionado.

En la tabla 9, se muestran los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de coca del Centro Poblado de Mayapo conformando consorcios. El consorcio bacteriano C1, está conformado por las bacterias de género *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.*; el consorcio bacteriano C2, está conformado por las bacterias de género *Acinetobacter sp.*; el consorcio bacteriano C3, está conformado por las bacterias de género *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Sphingomonas sp.*

La biodegradación del *p*-nitrofenol se dio mejor por el consorcio bacteriano C3 posiblemente por los la variedad de géneros encontrados. Desde hace tiempo se conoce que los consorcios microbianos son mucho más eficientes para degradar desechos orgánicos complejos que las cepas individuales de organismos o inclusive

mezclas de microorganismos debido a la diversidad de habilidades metabólicas³¹.

Diversos autores han descrito que el género de bacteria *Sphingomonas* son bacterias que mineralizan compuestos nitroaromáticos, estirpes bacterianas capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono, liberando nitrito al medio²⁹.

En la tabla 10, se muestran los porcentajes de los géneros de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de coca del Centro Poblado de Mayapo, observándose que de un total de 12 cepas bacterianas, 5 son de género *Acinetobacter* representando un 42 %, 4 son de género *Alcaligenes* representando un 33 % y 3 de género *Sphingomonas* representando un 25 % del total de cepas aisladas. En este resultado se observa que el género *Acinetobacter sp.* predomina en el aislamiento del resto de los otros géneros como *Alcaligenes sp.* y *Sphingomonas sp.*

Tomando en cuenta los distintos puntos de vista de los científicos coincidimos con todos al haber encontrado una diversidad de grupos microbianos, especialmente con Ahumada *et al.*⁸, coincidimos que el género *Acinetobacter* presentan la capacidad de degradar el *p*-nitrofenol.

Todas las bacterias gramnegativas, que poseen mayor incidencia en la degradación del fenol es dada por su capa lipídica y los mecanismos a nivel de membrana, aunque las grampositivas poseen esta capacidad pero en menos frecuencia⁸.

En nuestra investigación todas las bacterias aisladas son gramnegativas con capacidad de degradar el *p*-nitrofenol.

Estos resultados refuerzan al concepto ampliamente reportado acerca de los principales géneros en procesos de degradación del *p*-nitrofenol.

Con esta investigación se pretende contribuir al estudio de la microbiología de suelos con el aislamiento e identificación de bacterias nativas del Centro Poblado de Mayapo, asimismo mediante la identificación de especies microbianas en estas zonas se pretende ampliar la gama de microorganismos conocidos contribuyendo así al conocimiento de la biodiversidad de la microbiota de nuestro país que puede ser capaz de producir metabolitos de interés industrial biorremediar suelo contaminados con compuestos tóxicos

VI. CONCLUSIONES

1. Las cepas bacterianas degradadoras de *p*-nitrofenol aisladas de suelos de cultivo de *Erithroxylum coca* "coca" del Centro Poblado de Mayapo pertenecen a los

géneros: *Sphingomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.*

2. El consorcio microbiano C3 (*Sphingomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.*) logró degradar hasta un 98% en 72 horas a partir de una concentración inicial de 10 y 12 mg/L.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quahiba F. Degradación por medios bacterianos de compuestos químicos tóxicos. Comisión Técnica Asesora en: Ambiente y desarrollo sostenible [Monografía en internet]*, Buenos Aires, 2001 [acceso 08 de setiembre de 2011]; Disponible en: URL:<http://www.um.es/gtiweb/allmetadata/biodegradacion%20toxicos.htm>
2. Spain JC. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annu. Revmicrobiol [revista en internet]* 2010 setiembre a diciembre. [acceso 08 de febrero de 2011]; vol (10) Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.49.100195.002515>
3. Agua que se consume en el VRAE contiene metales de agroquímicos e insumos químicos. Diario Inforegión. San Francisco - VRAE 15 agosto 2011. Normativa:6 Disponible en: <http://www.inforegion.pe/portada/112937/agua-que-se-consume-en-el-vrae-contiene-metales-de-agroquimicos-e-insumos-quimicos/>
4. Chavez L. Efecto del metil partión en la diversidad bacteriana presente en el suelo de una chinampa de Xochimilco [Monografía en internet] México; 2009. [acceso 15 de octubre de 2011]; Disponible en: http://132.248.246.65/tesigrado/consulta/detpaterno.cfm?al_cuenta=862133
5. Bracho D. Degradación de *p*-Nitrofenol por bacterias en los ríos Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro [Monografía en internet]*, Puerto rico; 2007., [acceso 08 de noviembre de 2011]; Disponible en: URL: <http://grad.uprm.edu/oeg/TesisDisertacionesDigitales/Biologia>
6. Gemini V, Gallego A, Gómez CE, Planes EI, Korol SE. Empleo de procesos biológicos para detoxificar *p*-nitrofenol Hig. Sanid. Ambient [Revista en internet]* 2006 diciembre [acceso 18 de julio de 2013]; 6 (1). Disponible en: http://www.salud-publica.es/.../bc510158f645650_Hig.Sanid.Ambient.6.145

