

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Biodegradación de carbofurán por hongos aislados
de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa de
los Valles del Río Apurímac, Ene y Mantaro.
Ayacucho 2014.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE
MICROBIOLOGÍA**

Presentado por:

Bach. LLAMOCCA TOMAYLLA, Edher

AYACUCHO - PERÚ

2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.N. 204-2014-UNSCH-FCB-D

Bach. Edher Llamocca Tomaylla

En la ciudad de Ayacucho, el día doce de diciembre de dos mil catorce, en el auditorio de la Facultad, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, siendo las cuatro de la tarde con cinco minutos, reunidos los miembros del Jurado calificador, Presidido por el Dr. Tomás Castro Carranza decano de la facultad de Ciencias Biológicas e integrada por los profesores Dr. Víctor Humberto Alegría Valeriano (miembro), Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez, Mg. Serapio Romero Gavilán (miembro) y Dr. Edwin C. Enciso Roca (miembro) quien además actúa como secretario docente encargado, con la finalidad de recepcionar el trabajo de tesis titulada "Biodegradación de carbofurán por hongos aislados de suelos agrícolas del Distrito de Santa Rosa de los Valles del Río Apurímac, Ene y Mantaro. Ayacucho 2014 presentado por el bachiller en Ciencias Biológicas Edher Llamocca Tomaylla, quien pretende obtener el título Profesional de Biólogo con especialidad en microbiología.

Con la finalidad de que el Sr. Sustentante pueda dar inicio a su exposición se da a conocer el expediente presentado y estando conforme el Sr. Decano autoriza que de inicio a su exposición en un tiempo no mayor de cuarenta y cinco minutos; inmediatamente el Sr. Sustentante inicia su exposición con el agradecimiento a la universidad, docentes familiares y amigos.

Concluido con la exposición, el presidente del jurado evaluador solicita a los miembros del jurado evaluador para que puedan realizar sus preguntas y aclaraciones que crean conveniente.

Terminada la parte correspondiente a las preguntas, el presidente del jurado evaluador, solicita al sustentante y público asistente a abandonar el auditorio a fin de que el Jurado evaluador pueda realizar la Calificación correspondiente, quedando de la siguiente forma:

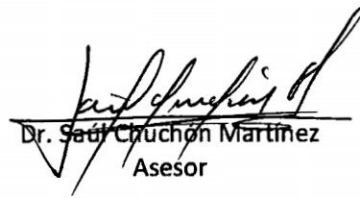
Miembro evaluador	Exposición	Respuesta a preguntas	Promedio
Dr. Víctor Alegría Valeriano	17	16	17
Dr. Saúl Chuchón Martínez	18	16	17
Dr. Edwin C. Enciso Roca	17	17	17
Mg. Serapio Romero Gavilán	18	16	17
Dr. Segundo Tomás Castro Carranza	18	16	17
Promedio			17

Una vez realizada la calificación se obtiene el Promedio de diecisiete (17) que es aprobatoria, luego se invita al sustentante y público asistente a ingresar al auditorio con la finalidad de dar a conocer el resultado y a la vez colocar la medalla y toma de la juramentación respectiva.

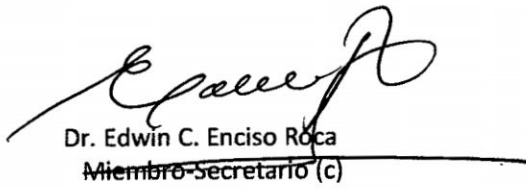
Concluida con acto los miembros del jurado evaluador firman al pie de la presente en señal de conformidad.
Finaliza la sustentación siendo las seis y quince de la tarde.



Dr. Victor Alejandro Valeriano
Miembro



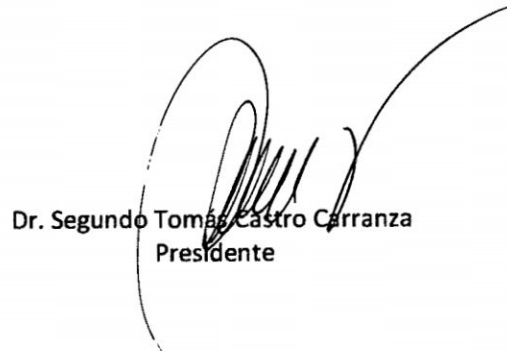
Dr. Saúl Chucho Martínez
Asesor



Dr. Edwin C. Enciso Roca
Miembro-Secretario (c)



Mg. Serapio Romero Gavilán
Miembro



Dr. Segundo Tomás Castro Carranza
Presidente

A mis padres Francisco y Gloria,
por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga mi reconocida y respetada *alma mater*, por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a los Docentes del Departamento Académico de Ciencias Biológicas quienes me brindaron sus conocimientos durante mi formación profesional .

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental por acceder al espacio, los materiales y los equipos que hicieron posible éste trabajo.

Al Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento como asesor, así como también por la paciencia para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

A mis padres Francisco Llamocca Paqui y Gloria Tomaylla Chuchón, las personas que hicieron en la vida que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre en mi corazón.

A mis amigos y los que fueron compañeros de clase, ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo han aportado las ganas de seguir adelante.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	03
2.1. Antecedentes	03
2.2. Clasificación de los plaguicidas	07
2.3. Biorremediación	15
2.3.1. Tipos de biorremediación	15
2.3.2. Degradación microbiana de plaguicidas	17
2.3.3. Uso de hongos en la biorremediación	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Características de zona de estudio	21
3.2. Toma de muestra	21
3.3. Metodología y recolección de datos	22
3.3.1. Determinación de las concentraciones de carbofurán que presentan mejor crecimiento de hongos	22
3.3.2. Aislamiento de hongos degradadores de carbofurán	23
3.3.3. Curva patrón para la determinación de carbofurán	23
3.3.4. Evaluación de la capacidad degradadora de carbofurán	24
3.4. Análisis de datos	25
3.5. Identificación de cepas degradadoras de carbofurán	25
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	55
VII. RECOMENDACIONES	57
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según el organismo que interesa controlar	7
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según peligrosidad recomendada por la Organización Mundial de la Salud	9
Tabla 3. Géneros de microorganismos heterótrofos que usan pesticidas	19
Tabla 4. Composición del ensayo para la determinación de las concentraciones de carbofurán que presentan mejor crecimiento de hongos	22
Tabla 5. Valores de recuento del número de colonias en el ensayo de determinación de la concentración de carbofurán que presenta mejor crecimiento de hongos	28
Tabla 6. Número de cepas que forman el consorcio de hongos aislados a partir de suelos agrícolas de cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao" y <i>Erythroxylum coca</i> "coca"	29
Tabla 7. Valores de estandarización de la curva patrón para la cuantificación de carbofurán	30
Tabla 8. Valores de análisis de varianza de la biodegradación de carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao" a diferentes concentraciones	41
Tabla 9. Valores de análisis de varianza de la biodegradación de carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca" a diferentes concentraciones	42
Tabla 10. Características culturales del consorcio de hongos, aislados de suelos con cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao", con capacidad degradadora de carbofurán mostradas en tres tipos de medio de cultivo	43
Tabla 11. Características culturales del consorcio de hongos, aislados de suelos con cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca", con capacidad biodegradadora de carbofurán mostradas en tres tipos de medio de cultivo	45

Tabla 12. Identificación del consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" y *Erythroxylum coca* "coca"

46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura molecular de los carbamatos	11
Figura 2. Fórmula global de carbofurán	12
Figura 3. Tipos de biorremediación	14
Figura 4. Metabolismo microbiano de contaminantes	17
Figura 5. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 10 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao"	31
Figura 6. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 10 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca"	32
Figura 7. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 20 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao"	33
Figura 8. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 20 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca"	34
Figura 9. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 30 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao"	35
Figura 10. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca"	36
Figura 11. Porcentaje de biodegradación del carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao" en relación a diferentes concentraciones de carbofurán aislados de suelos con cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca", con capacidad biodegradadora de carbofurán mostradas en tres tipos de medio de cultivo	37
Figura 12. Porcentaje de biodegradación del carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca" en relación a diferentes concentraciones de carbofurán	38

- Figura 13.** Cantidad total de carbofurán degradado por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" en relación a diferentes concentraciones de carbofurán 39
- Figura 14.** Cantidad total de carbofurán degradado por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca" en relación a diferentes concentraciones de carbofurán 40

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Mapa del uso actual del territorio regional de Ayacucho	66
ANEXO 2. Densidad de cultivo de "coca" en el VRAEM, 2013	67
ANEXO 3. Suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa-VRAEM con cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao" y <i>Erythroxylum coca</i> "coca"	68
ANEXO 4. Aplicación de plaguicidas en cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca" y deforestación de bosques para su cultivo. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.	69
ANEXO 5. Eliminación inadecuada de frascos con pesticidas utilizados para los cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca" adquiridos de establecimientos que comercializan plaguicidas agrícolas. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.	70
ANEXO 6. Modo de muestreo de suelos agrícolas de distrito de Santa Rosa-VRAEM	71
ANEXO 7. Representación comercial de carbofurán (Diafurán)	72
ANEXO 8. Distribución del cultivo de coca en el VRAEM, 2009 – 2013 (ha)	73
ANEXO 9. Composición del medio de cultivo Busnell Hass	74
ANEXO 10. Flujograma del aislamiento de hongos degradadores de carbofurán	75
ANEXO 11. Colonias sobre agar Busanell Hass enriquecidos con carbofurán a 30 mg/l y la purificación y aislamiento en ceparios con agar Sabouraud	76
ANEXO 12. Flujograma de estandarización de la curva patrón	77
ANEXO 13. Reacción cromogénica de DAPSONA a diferentes concentraciones de carbofurán para la determinación de la curva patrón	78
ANEXO 14. Curva y ecuación patrón estandarizado para la determinación de las concentraciones de carbofurán	79

ANEXO 15.	Espectro de absorción entre el reactivo blanco con la reacción del producto hidrolizado de carbofurán y Dapsona Diazotado en medio alcalino	80
ANEXO 16.	Proceso de medición de la absorbancia	81
ANEXO 17.	Flujograma de ensayo de biodegradación de carbofurán por el consorcio de hongos	82
ANEXO 18.	Reacción química de carbofurán con DAPSONA en medio alcalino	83
ANEXO 19.	Características fisicoquímicas de Dapsona	84
ANEXO 20.	Rutas metabólicas empleadas por los microorganismos para la degradación de carbofurán	85
ANEXO 21.	Valores de absorbancia en relación a diferentes concentraciones de carbofurán obtenidas durante el ensayo de biodegradación por hongos aislados a partir de suelos con cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao"	86
ANEXO 22.	Valores de absorbancia en relación a diferentes concentraciones de carbofurán obtenidas durante el ensayo de biodegradación por hongos aislados a partir de suelos con cultivos de <i>Erythroxyllum coca</i> "coca"	87
ANEXO 23.	Valores estadísticos descriptivos a diferentes concentraciones de carbofurán	88
ANEXO 24.	Prueba de Tukey para la comparación de diferencia entre las medias de los distintos tratamientos en relación a diferentes concentraciones de carbofurán en el ensayo de biodegradación con hongos aislados de suelos con cultivo de <i>Theobroma cacao</i> "cacao" y <i>Erythroxyllum coca</i> "coca"	89
ANEXO 25.	Gráfico de Box-Plot del ensayo de biodegradación de carbofurán por hongos aislados a partir de suelos con cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao" y <i>Erythroxyllum coca</i> "coca"	90

ANEXO 26.	Hongos cultivados en agar Sabouraud, aislados a partir de suelos con cultivos de <i>Theobroma cacao</i> "cacao"	91
ANEXO 27.	Hongos cultivados en agar Sabouraud, aislados a partir de suelos con cultivos de <i>Erythroxylum coca</i> "coca"	92
ANEXO 28.	Cepas de hongos degradadores de carbofurán en tres medios de cultivos diferentes y su observación microscópica, aislados a partir de suelos con cultivo de <i>Theobroma cacao</i> "cacao"	93
ANEXO 29.	Cepas de hongos degradadores de carbofurán en tres medios de cultivos diferentes y su observación microscópica, aislados a partir de suelos con cultivo de <i>Erythroxylum coca</i> "coca"	95
ANEXO 30.	Matriz de consistencia	97

RESUMEN

La actividad agrícola en el VRAEM está sometida al uso constante de pesticidas, (carbofurán) utilizados para lograr altos niveles de productividad en los cultivos de "coca". La acumulación y persistencia de estas sustancias es una de las causas más importantes de los problemas de salud del hombre y de la alteración del ambiente por ser sustancias recalcitrantes. Los hongos y sus enzimas están involucradas en la biotransformación de una diversidad de polímeros orgánicos complejos y debido a su inespecificidad de su sistema multienzimático es posible plantear procesos de biorremediación; por lo que, aislar hongos con capacidad de biodegradación de estos contaminantes y evaluar la capacidad biodegradadora del carbofurán, bajo un tipo de investigación descriptivo, fueron los objetivos de éste trabajo. El muestreo fue realizado a partir de suelos agrícolas, con cultivos de "cacao" y "coca", del distrito de Santa Rosa. Las concentraciones 10, 20 y 30 mg/l de carbofurán fueron determinadas como concentraciones óptimas de crecimiento de hongos, de las cuales fueron aisladas en agar Busnell Hass con 30 mg/l de carbofurán, posteriormente se procedió a obtener el consorcio de hongos mediante su purificación y conservación en agar Sabouraud. El ensayo de biodegradación de carbofurán se realizó con tratamientos de 10, 20, y 30 mg/l de carbofurán por un periodo de 45 días y evaluadas por espectrofotometría mediante la técnica cromogénica de "DAPSONA" en el cual se obtuvo una degradación hasta 79% y 59% correspondientes a los ensayos con hongos aislados de suelos de cultivos de "cacao" y "coca" respectivamente. Resulta a la vez la influencia del número de cepas que fueron inoculadas en los ensayos y las concentraciones de carbofurán sobre la actividad del consorcio de hongos, logrando una máxima biodegradación en el tratamiento de 10 mg/l donde las concentraciones disminuyeron a 2,30 mg/l y 3,85 mg/l correspondientes a los ensayos con hongos aislados de suelos de cultivos de "cacao" y "coca" respectivamente, la cual fue contrastada por análisis de varianza. Luego, se identificaron cuatro géneros de hongos de 18 cepas aisladas, las cuales son: *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Paecilomyces sp.* y *Penicillium sp.* Concluyendo que los hongos aislados a partir de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa presentan capacidad biodegradadora del carbofurán, pero que se ven influenciados a concentraciones mayores de pesticida y por el número de cepas que conforman el consorcio.

Palabras clave: plaguicidas, carbofurán, hongos y biodegradación.

I. INTRODUCCIÓN

Una de las más grandes preocupaciones que existe hoy en día en el Perú es la excesiva utilización de productos químicos para la agricultura y en especial en el VRAEM. En los últimos años ha llamado la atención el incremento del uso de insumos agroquímicos utilizados en la producción de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" y *Erythroxylum coca* "coca". Se precisa que para lograr altos niveles de productividad de éstos cultivos, son sometidos a la aplicación de frecuentes y altas dosis de agroquímicos como el carbofurán. Se estiman, que anualmente se aplica alrededor de 700 mil litros de agroquímicos¹, contaminando ríos, suelos y depredando la flora y fauna de los valles cocaleros. La falta de conocimiento de los productores, que no miden las consecuencias ambientales al usar grandes cantidades de productos agroquímicos, al ser utilizados persisten un tiempo en un suelo agrícola y luego por factores climáticos discurren a los cursos de agua afectando la biodiversidad y a la población, ocasionando enfermedades por acumulación de toxinas.²

Por otro lado, existen procesos de biodegradación que se deben fundamentalmente a la microbiota del suelo. La extensión del metabolismo microbiano puede ir desde transformaciones menores que no afectan significativamente a las propiedades químicas o toxicológicas del plaguicida, hasta procesos de mineralización, como es la degradación de plaguicidas hasta la obtención de CO_2 , H_2O , NH_4^+ , Cl^- , etc. La tasa de metabolismo puede oscilar entre extremadamente lento, vida media de años, hasta rápido, vida media de días³. La presencia de residuos en altas concentraciones puede afectar a la microbiota del suelo; sin embargo, existen microorganismos como los hongos capaces de metabolizar diferentes insecticidas, debido a que han sido el resultado de un proceso de evolución de poblaciones microbianas autóctonas que se han adaptado a estos contaminantes ya que están involucradas en la

biotransformación de una diversidad de polímeros orgánicos complejos del cual algunos constituyen contaminantes ambientales por lo que abre el espacio para la incorporación en procesos de biorremediación.⁴

En el presente trabajo se aislaron hongos de suelos agrícolas con mayor actividad agraria de *Theobroma cacao* "cacao" y *Erythroxylum coca* "coca" del distrito de Santa Rosa de los Valles del Ríos Apurímac, Ene y Mantaro del departamento de Ayacucho ya que éstos suelos al estar constantemente sometidos al uso de agroquímicos hace que existan residuos de éstas sustancias (carbofurán) a nivel de tierras de cultivo. Pero a la vez, la presencia de residuos de éstos pesticidas en el ambiente permite que existan hongos con capacidad biodegradadora de éstas sustancias como el carbofurán por lo que es posible encontrar especies microbianas autóctonas.

Teniendo en cuenta éstas consideraciones se planteó como objetivo general; determinar la capacidad biodegradadora del carbofurán por hongos aislados de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa VREAM, Ayacucho 2014. Mientras que; aislar hongos con capacidad de biodegradar el carbofurán, evaluar la capacidad biodegradadora del carbofurán e identificar los principales géneros de hongos con capacidad degradadora del carbofurán; fueron los objetivos específicos de éste trabajo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

En África, Slaoui *et al.*,⁵ en el estudio titulado "Biodegradación del carbofurán por un hongo aislado de suelo tratado" lograron caracterizar un miembro del género *Gliocladium* capaz de utilizar carbofurán (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzo-furanyl methylcarbamate) como fuente de carbono y de energía que exhibe la más alta capacidad de degradación a otros géneros aislados. El porcentaje de pesticida residual que utilizaron fue determinado por cromatografía. Los metabolitos formados por la cepa *Gliocladium* fueron detectados por cromatografía en capa fina. Por lo cual lograron determinar un alto nivel de actividad de degradación del carbofurán, pero no consiguieron determinar la degradación de los nematicidas organofosforados.

Seo *et al.*,⁶ investigaron la "Biodegradación del carbofurán y fenol carbofurán por el hongo *Mucor ramannianus* y la identificación de los metabolitos" mediante el cual dando ciertas condiciones de cultivo para los hongos, utilizaron caldo papa dextrosa (CPD) conteniendo carbofurán y carbofurán fenol en una concentración final de 1 mM a 27 °C en un incubadora de agitación con 200 rpm durante 10 días, utilizaron la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía líquida / espectrometría de masas (LC/MS); llegaron a la conclusión que en base a los metabolitos de *M. ramannianus* pueden adoptar diferentes pistas de utilización de carbofurán y fenol carbofurán, aunque los dos compuestos tienen estructuras similares. Los metabolitos de la degradación de carbofurán por otros microorganismos incluyen distintos metabolitos similares, sin embargo manifiestan que ningún estudio ha sido llevado para identificar metabolitos microbianos de carbofurán resultantes de la escisión de anillos aromáticos o furanilo por lo que éstos investigadores sugieren que un posible metabolito intermedio de cualquiera de los dos metabolitos que produjo *M.*

ramannianus podría ser resultado de la degradación de carbofuran-7-fenol por hidrólisis en el anillo furanilo, resultante de la degradación fúngica de fenol carbofurán. Los resultados, proporcionarán información válida para la evaluación de riesgos ambientales relacionados con los plaguicidas del carbofurán.

Yang *et al.*,⁷ en la investigación titulada "Biodegradación de carbofurán por *Pichia anomala* cepa HQ-C-01 y su aplicación para la biorremediación de suelos contaminados", detectaron la levadura *Pichia anomala* por el aislamiento a partir de lodos activados contaminados con carbamatos por el procedimiento de enriquecimiento que les ha permitido seleccionar algunos aislados con una actividad degradante de carbofurán, la cepa HQ-C-01 degradó el 95,2% de carbofurán cuando el insecticida se usa como fuente de carbono por lo que sólo se añadió 50 mg/L en un medio de sales minerales por 48 horas. La concentración óptima, la temperatura y el pH del medio fueron 50 mg/L, 30°C, y pH 7,5 respectivamente. Utilizaron la cromatografía de gases y espectrometría de masa de los cuales los análisis mostraron que la cepa metaboliza carbofurán para producir benzofuranol como el metabolito intermedio, el cual fue más degradado. Sin embargo, éstos investigadores manifiestan que hay pocos datos disponibles sobre la actividad degradante de cepas en suelos contaminados con carbofurán. A pesar que la cepa HQ-C-01 es eficaz en la degradación de carbofurán en el suelo contaminado, se necesita más investigación para utilizar la cepa para la biorremediación en la escala de campo.

En India, Das *et al.*,⁸ en la investigación titulada "Influencia y persistencia de los insecticidas carbofurán y forato sobre los microorganismos en el campo de arroz", realizaron un experimento en microparcels (4 m x 4 m) con dos insecticidas, forato y carbofurán a tasas de 1,5 y 1,0 kg /Ha respectivamente, para investigar su efecto sobre la población y la distribución de bacterias, actinomicetos y hongos; así como la persistencia de los residuos de insecticidas en los suelos de la rizosfera de arroz. La aplicación de los insecticidas estimuló la población de bacterias, actinomicetos y hongos en los suelos de la rizosfera, y la estimulación fue más pronunciada con forato en comparación con carbofurán. Los insecticidas no tenían marcado efecto sobre el número de *Streptomyces* y *Nocardia* en los suelos de la rizosfera. Sin embargo, el crecimiento de *Bacillus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* con forato fue mayor y *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Aspergillus* y *Phytophthora* con carbofurán se incrementaron. Por otra parte, los

números de *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Fusarium*, *Humicola* y *Rhizopus* con forato y *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Fusarium*, *Humicola* y *Rhizopus* con carbofurán fueron inhibidos. Tanto los insecticidas persistieron en el suelo de la rizosfera para un corto período de tiempo y la tasa de disipación de carbofurán.

Domínguez *et al.*,⁴ en la investigación titulada “Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca” manifiestan que los hongos de la podredumbre blanca son un grupo de microorganismos que desempeñan un papel clave como reguladores del ciclo del carbono. Son activos transformadores de la lignina. Sus enzimas ligninolíticas están directamente involucradas no solo en la degradación de la lignina, sino también, en la biotransformación de una diversidad de polímeros orgánicos complejos de los cuales algunos constituyen contaminantes ambientales, con una estructura química similar a la lignina. Esto se debe a la inespecificidad de su sistema multienzimático, lo que abre el espacio para su incorporación en procesos de biorremediación. Presentan resultados preliminares de la inducción de las enzimas ligninolíticas con la utilización del DDT como inductor de las actividades enzimáticas mediante cepas nativas de hongos de la podredumbre blanca.

Los basidiomicetos ligninolíticos han demostrado gran capacidad biodegradativa para un amplio espectro de COPs, incluido el DDT. Esta capacidad ha sido atribuida a su habilidad para degradar la lignina presente en la madera⁹. La mayoría de los trabajos sobre la degradación del DDT por hongos ligninolíticos se ha llevado a cabo utilizando como modelo el hongo *Phanaerochaete chrysosporium* en cultivos con bajo contenido de nitrógeno para inducir condiciones ligninolíticas. Todos estos estudios permitieron plantear una ruta para la degradación en hongos, la cual difiere de la propuesta para la degradación por bacterias.

Quintero¹⁰, en su estudio sobre “Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la pudrición Blanca de la Madera”. Manifiesta la característica de los hongos de capacidad para degradar y mineralizar la lignina empleando un sistema enzimático extracelular compuesto principalmente de tres enzimas Ligninoperoxidasa (LiP), Manganese peroxidasa (MnP) y Lacasa. Orienta la atención a estos hongos y su sistema enzimático ligninolítico para estudiar la capacidad para degradar un amplio rango de compuestos xenobióticos como

plaguicidas, colorantes, explosivos, etc. Sin embargo, observa que gran número de compuestos entre ellos los plaguicidas no responden al proceso degradativo de las enzimas ligninolíticas y esto ha permitido descubrir recientemente nuevos mecanismos empleados por estos hongos como son los sistemas oxidativos de las monooxigenasas del citocromo P-450 y reductivo de las transferasas, ya ampliamente conocidos en animales superiores e identificados como fase I y fase II del metabolismo. Describe estos tres tipos de mecanismos degradativos hasta ahora conocidos que son empleados por los hongos para la degradación de contaminantes ambientales.

Bending *et al.*,¹¹ en el estudio titulado "Degradación de los plaguicidas por Hongos de pudrición blanca y su relación con el Potencial Ligninolítico" Investigaron la capacidad de las nueve especies de hongos de la pudrición blanca de una variedad de órdenes de basidiomicetos para degradar pesticidas mono-aromáticos. No obtuvieron relación entre la degradación del colorante Poli R-478, una prueba presuntiva de potencial ligninolítico, y la degradación del diurón, metalaxil, atrazina o la terbutilazina en cultivo líquido. Sin embargo, hubo correlaciones positivas significativas entre las tasas de degradación de los diferentes plaguicidas. Después de 42 días, la degradación máxima de diurón, atrazina y la terbutilazina fue superior a 86%, pero para metalaxil menos del 44%.

Chuchón¹² en la investigación titulada "Biodegradación de carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Chiara, Ayacucho-2012" utilizó concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40, y 50 mg/l de carbofurán en medio mineral Busnell Hass para el aislamiento de bacterias, seguido en agar con 30 mg/l de carbofurán, posteriormente purificó y conservó las cepas aisladas en agar nutritivo. El ensayo de biodegradación de carbofurán realizó con tratamientos a 10, 20, 30, 40, 50, y 60 mg/l de carbofurán por un periodo de 30 días, en la cual mediante la técnica cromogénica "DAPSONA" determinó las concentraciones de carbofurán, en el cual obtuvo una degradación hasta 83%, 61%, 51%, 50%, 41% y 22% respectivamente; donde menciona que la concentración de carbofurán (tratamiento) influye sobre la actividad del consorcio bacteriano, logrando una máxima biodegradación en los tratamientos 40 mg/l y 50 mg/l hasta 18,6 mg y 20,9 mg de carbofurán, lo cual contrastó éstos resultados mediante el análisis de varianza. Los géneros de bacterias que logró identificar fueron: *Bacillus*,

Pseudomonas, Flavobacterium, Klebsiella, Serratia, Proteus, Corynebacterium, Micrococcus, Areomonas, Citrobacter y dos especies no identificadas.

2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS

Dada la gran cantidad de familias químicas implicadas, la clasificación de los plaguicidas resulta difícil. Un recurso útil es clasificarlos en función de las plagas sobre las que se usan. Otra posibilidad es hacer una clasificación en relación con la familia química, que suministra mayor información sobre su toxicidad. En general, se tiende a hacer una clasificación mixta por ambos criterios.¹³ Existen tres formas de clasificar a los plaguicidas:

- Según el tipo de organismo que se desee controlar.
- Según la toxicidad aguda.
- Según el grupo químico.

2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS SEGÚN EL ORGANISMO QUE INTERESA CONTROLAR

Ésta clasificación se resume según al cuadro establecido por Benítez.¹³

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según el organismo que interesa controlar.

Tipo de plaguicida		Organismo que interesa controlar
Insecticida	Larvicida	Larvas de insectos
	Formicida	Hormigas
	Pulguicida	Pulgas
	Piojicida	Piojos
	Aficida	Pulgones
Acaricida	Garrapaticida	Garrapatas
Nematicida		Nemátodos
Molusquicida		Moluscos
Rondeticida		Roedores
Avicida	Columbicida	Aves (palomas)
Bacteriostático y bactericida		Bacterias
Fungicida		Hongos
Herbicida		Plantas indeseadas

2.2.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN TOXICIDAD AGUDA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado - sujeta a actualizaciones periódicas - una clasificación de plaguicidas según el grado de peligrosidad, entendiendo ésta como su capacidad de producir daño agudo a la

salud cuando se dan una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto (14).

Esta clasificación se basa en la dosis letal media (DL_{50}) aguda, por vía oral o dérmica en ratas.

La DL_{50} es la cantidad de una sustancia que es necesario ingerir de una sola vez para producir la muerte del 50% de los animales en ensayo. Esta dosis se expresa generalmente en mg/kg del peso del animal ensayado. Es un valor estadístico que normalmente se expresa con un número, pero en algunos casos puede ser un rango. La DL_{50} en el caso de los plaguicidas, debe determinarse para las diferentes rutas de exposición (oral, dérmica y respiratoria) y en diferentes especies de animales. Normalmente la DL_{50} se expresa por vía oral y para ratas.¹⁵

La DL_{50} está relacionada exclusivamente con la toxicidad aguda de los plaguicidas. No mide su toxicidad crónica, es decir aquella que surge de pequeñas exposiciones diarias al plaguicida a través de un largo período. Es decir que un producto con una baja DL_{50} puede tener graves efectos crónicos por exposición prolongada, como por ejemplo provocar cáncer. Además en la vida real nadie está expuesto a un solo plaguicida sino a varios y esto tampoco lo contempla la DL_{50} . En este caso se deben considerar los efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos que ocurren en nuestro organismo al estar expuestos a más de un plaguicida.

La DL_{50} tampoco refleja cabalmente los efectos a corto plazo ya que no da una idea de que porcentaje de la población bajo estudio se sintió mareada o con problemas de coordinación.

En caso de que un plaguicida ocasione daño a órganos vitales, posea efectos acumulativos muy marcados, sea particularmente peligroso o alergénico, la OMS realiza ajustes en su clasificación, ubicándolo en una categoría que indique mayor peligro. De esta forma la clasificación se basa en la DL_{50} de los plaguicidas, pero no utiliza exclusivamente este parámetro.¹⁵

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según peligrosidad recomendada por la Organización Mundial de la Salud.

CATEGORÍA	DL ₅₀ Rata (mg/kg peso corporal)			
	Oral		Dérmica	
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
Ia Extremadamente peligroso (color rojo)	5 ó menos	20 ó menos	10 ó menos	40 ó menos
Ib Altamente peligroso (color amarillo)	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II Moderadamente peligroso (color amarillo)	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III ligeramente peligroso (color azul)	Sobre 500 – 2000	Sobre 2000 – 3000	Sobre 1000	Sobre 4000
IV Productos que probablemente no representan un riesgo agudo en uso normal (color verde)	Mayor de 2000	Mayor de 3000		

Fuente: *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard*, 2004.¹⁶

2.2.3. CLASIFICACIÓN SEGÚN LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PESTICIDAS

Los pesticidas químicos constituyen el arma más eficaz para el control biológico que se dispone actualmente. Los más importantes pueden clasificarse de la siguiente manera.¹⁷

- a) Organoclorados.
- b) Organofosforados.
- c) Derivados del ácido carbámico o carbamatos.
- d) Rotenona y derivados.

2.2.3.1. INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS

Estos compuestos se caracterizan por su gran estabilidad química y por lo tanto, permanecen en el medio ambiente por un tiempo muy prolongado.

Son muy poco solubles en agua, son solubles en solventes orgánicos y tienden a acumularse en el tejido graso de los seres vivos. Estos compuestos se clasifican en los siguientes grupos.¹⁸

- a) Difenilalifático, DDT y análogos.
- b) Hexaclorociclohexano y
- c) Ciclodienos.

2.2.3.2. INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Término que incluye todos los insecticidas que contienen fósforo. Se usan otros nombres, pero ya están en desuso y son: *fosfatos orgánicos, insecticidas fosforados, parientes de los gases nerviosos, y ésteres del ácido fosfórico*. Todos los organofosforados son derivados de uno de los ácidos del fósforo, y como clase generalmente son los más tóxicos de todos los pesticidas para los vertebrados. Debido a la similitud de la estructura química de los OPs con la de los "gases nerviosos," sus modos de acción también son similares. Sus cualidades insecticidas fueron observadas por primera vez en Alemania durante la II Guerra Mundial cuando se estudiaban los gases nerviosos OPs *sarin, soman, y tabún* que son extremadamente tóxicos. Inicialmente, el descubrimiento fue hecho cuando se buscaban substitutos para la nicotina, la cual se usaba intensamente como insecticida pero que escaseaba en Alemania.¹⁸

2.2.3.3. INSECTICIDAS CARBAMATOS

Son ésteres del ácido carbámico con el fenol o naftol, en los que el grupo amino está sustituido por uno o dos radicales alquilo. La mayoría de los compuestos con efecto insecticida corresponden a un derivado N-metilo. El más conocido es el Sevin o Carbanil. En general, estos insecticidas son relativamente específicos, afectando algunos ciertos insectos, mientras que otros sufren síntomas de intoxicación. Tal como los organofosforados, los carbamatos ejercen su efecto tóxico, a través de la inhibición de la acetilcolinesterasa.¹⁷ Otros insecticidas carbamatos que han durado mucho en el mercado son metomilo(Lannate®), carbofurán (Furadan®), aldicarb (Temik®), oxamilo (Vydate®), tiodicarb (Larvin®), metiocarb (Mesurol®), propoxur (Baygon®), bendiocarb (Ficam®), carbosulfán (Advantage®), aldoxicarb (Standak®), promecarb(Carbamult®), y fenoxicarb (Logic®, Torus®). Carbamatos que han entrado más recientemente al mercado incluyen pirimicarb, indoxacarb (registrado en el 2000), alanicarb y furatiocarb.¹⁸

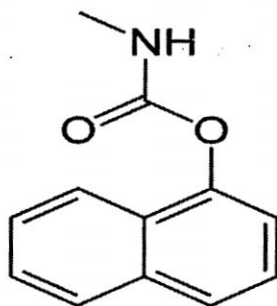


Figura 1. Estructura molecular de los carbamatos.¹⁸

Los carbamatos inhiben la colinesterasa (ChE) de la misma manera que lo hacen los OPs, y se comportan de una manera casi idéntica en los sistemas biológicos, pero con dos diferencias principales. Algunos carbamatos son potentes inhibidores de la aliesterasa (son esterasas alifáticas misceláneas cuyas funciones exactas no son conocidas), su selectividad algunas veces es más pronunciada contra la ChE de diferentes especies. Segundo, la inhibición de la ChE por los carbamatos es reversible. Cuando la ChE es inhibida por un carbamato, se dice que está carbamitada, de la misma manera que un OP resulta en que la enzima esté fosforilada, En insectos, los efectos de los OPs y los carbamatos son principalmente el envenenamiento del sistema nervioso central, porque la unión neuromuscular de los insectos no es colirgénica, como lo es en los mamíferos. Las únicas sinapsis colinérgicas que se conocen en los insectos están en el sistema nervioso central nervioso central.¹⁸

2.2.3.3.1. CARBOFURÁN

El carbofurán o carbofurano es un plaguicida sistémico utilizado como insecticida, acaricida y nematocida de amplio espectro, que pertenece al grupo químico de los carbamatos. Conjuntamente con los insecticidas organofosforados, los compuestos piretroides y otros carbamatos, el carbofurano integra un grupo sustituto de insecticidas persistentes como el DDT, clordano y heptacloro. Su nombre químico (IUPAC) es 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato y su fórmula química: C₁₂H₁₅NO₃.¹⁸

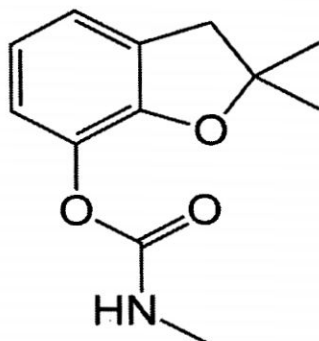


Figura 2. Fórmula global de carbofurán.¹⁸

A temperatura ambiente el carbofurán es un sólido cristalino, de color blanco o gris, en forma de gránulos (similar a la arena). Es inodoro o con ligero olor fenólico, y una solubilidad en el agua que llega a 700 mg/l a 25 °C. Si bien es muy poco soluble en los solventes convencionales utilizados en las formulaciones de uso agrícola, presenta solubilidades elevadas en diversos solventes orgánicos. Los propios distribuidores advierten que es tóxico y peligroso para el medio ambiente.¹⁸

a. Usos

Se usa para el control de insectos y nemátodos de una gran variedad de cultivos, especialmente maíz, trigo, arroz, soja, papas, girasol, frutas (melón, uvas) y hortalizas, entre muchos otros. En Argentina ha sido utilizado para eliminar loros – aves que se alimentan de cultivos anuales y perennes, aplicándolo en sus nidos.¹⁸

b. Modo de acción

Actúa interfiriendo los impulsos nerviosos por inhibición de la acetilcolinesterasa e ingresa en los organismos principalmente por contacto e ingestión, y en menor medida por inhalación. Su efecto sistémico, al ser absorbido por las raíces de las plántulas, le confiere acción de ingestión sobre pulgón e insectos de las partes aéreas.¹⁹

c. Persistencia

Posee una vida media en suelos de 30 a 60 días. Se degrada principalmente por acción microbiológica, generando dióxido de carbono. La persistencia ambiental del carbofurano está controlada por su degradación por vías química,

fotoquímica y bioquímica. La primera de ellas está preeminentemente asociada a la hidrólisis, con tiempos de vida media para este mecanismo de reacción comprendidos entre 2 días, a pH=9,5 y 1700 días, a pH=5,2 teniendo influencia directa la temperatura sobre la tasa de hidrólisis, además del pH. La fotólisis directa y la fotooxidación por el mecanismo de radicales libres constituyen una importante vía de degradación del carbofurano, habiéndose observado en estudios de laboratorio una fotodescomposición significativa dentro de 96 horas. La volatilización no aparece como una vía significativa de remoción del carbofurano.²⁰

Este plaguicida tiene baja adsorción en el suelo, variando su tiempo de vida media entre varios días y más de 3 meses. La escasa retención en el suelo y su relativa alta solubilidad acuosa determinan una migración considerable del carbofurano hacia el medio ambiente, donde el tiempo de vida medio está fuertemente influenciado por el pH. Así, para aguas superficiales se han reportado tiempos de vida medios comprendidos entre 5,1 semanas, a pH=7, y 1, 2 horas, a pH=10.²⁰

En Colombia, un estudio realizado por investigadores del grupo Prospectiva Ambiental, de la Universidad Nacional en Palmira, determinó la baja biodegradabilidad del carbofurano en el ambiente. Las pruebas de laboratorio arrojaron que este plaguicida, después de su aplicación, permanece en el agua a lo largo de los meses, inclusive por años. Esta situación se agrava con el riego de los cultivos o las lluvias, actividades y fenómenos que arrastran el plaguicida hacia las aguas superficiales o subterráneas, aumentando así el riesgo de su contacto con los seres humanos.¹⁹

d. Efectos en la salud

Los seres humanos pueden absorber el carbofurano por inhalación, por ingestión, por la piel y a través de los ojos. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) destaca el peligro de intoxicación aguda que presenta este plaguicida a las personas expuestas a su acción. Señala que, como es altamente tóxico, la exposición a las más pequeñas cantidades de esta sustancia química genera un riesgo importante. Por eso, considera que el riesgo de residuos de carbofurano en los alimentos es preocupante para todos los subgrupos de la población, especialmente para los niños de entre 1 y 2 años de edad. La exposición a través del agua potable es un riesgo adicional para los

consumidores de fuentes específicas y vulnerables, en especial las asociadas a determinados tipos de suelo y modos de uso del plaguicida.

Asimismo, la EPA advierte que también son preocupantes los riesgos ocupacionales, aun cuando se adopten medidas estrictas de protección. Las preocupaciones expresadas por la EPA se fundamentan en incidentes de envenenamiento humano asociadas a exposición ocupacional a este agrotóxico.²¹

e. Efectos en el medio ambiente

Las empresas distribuidoras reconocen que el carbofurano es muy tóxico para peces, aves y abejas. Según la EPA, el carbofurano presenta riesgos preocupantes para las especies acuáticas y aviares, para pájaros, mamíferos e invertebrados, en todos los usos registrados del plaguicida.

Vecinos de la localidad de Punta Indio - provincia de Buenos Aires, Argentina - están sustentando una demanda judicial contra productores de la zona a causa de la mortandad de aves asociada al uso del plaguicida carbofurano. El Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), informó que luego de finalizar una serie estudios y análisis de laboratorio que permitió ir descartando diversas hipótesis, había llegado a la conclusión que la muerte de las aves se debió a una intoxicación aguda de origen alimentario por carbamatos. En los contenidos del buche de palomas y de una de las perdices muertas se confirmó la presencia de carbofurano.¹⁹

En países europeos se ha producido a través de los años una gran mortandad de animales silvestres por esta causa. Incluso en la actualidad el carbofurano y otros carbamatos se siguen usando deliberada e ilegalmente como venenos contra predadores. En España, los productos tóxicos que fueron encontrados en el mayor número de casos de envenenamiento de animales silvestres el año 1999 fueron el aldicarb y el carbofurano. Este último siguió siendo detectado en los años posteriores en la mayoría de los cebos colocados en forma ilegal para exterminar predadores. Las especies más afectadas en ese país han sido el águila imperial ibérica, buitre leonado, milano real, buitre negro y zorro. Las organizaciones ambientalistas solicitaron la adopción de medidas para frenar este problema.²²

2.3. BIORREMEDIACIÓN

En las últimas décadas, entre las técnicas empleadas para contrarrestar los efectos de los contaminantes, se comenzó a utilizar una práctica llamada biorremediación. El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los 80, y proviene del concepto de "*remediation*", que hace referencia a la aplicación de estrategias físico-químicas para evitar el daño y la contaminación en suelos. Los científicos se dieron cuenta que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas esencialmente en la observación de la capacidad de los microorganismos de degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes. Entonces, la biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos (microorganismos y plantas) capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrio en el medio ambiente, ya sea suelo, sedimento, fango o mar.²³

2.3.1. TIPOS DE BIORREMEDIACIÓN

En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de ciertos microorganismos o plantas capaces de degradar o acumular sustancias contaminantes tales como metales pesados y compuestos orgánicos derivados de petróleo o sintéticos. Básicamente, los procesos de biorremediación pueden ser de tres tipos:

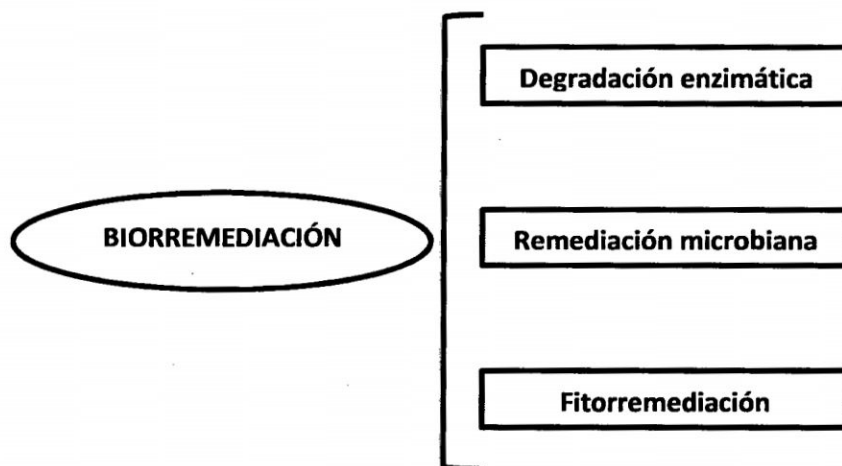


Figura 3. Tipos de biorremediación.²³

a. Degradación enzimática

Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se

obtienen en fermentadores por bacterias nativas o por bacterias modificadas genéticamente. Por ejemplo, existe un amplio número de industrias de procesamiento de alimentos que producen residuos que necesariamente deben ser posteriormente tratados. En estos casos, se aplican grupos de enzimas que hidrolizan polímeros complejos para luego terminar de degradarlos con el uso de microorganismos. Estas enzimas son utilizadas en tratamientos en donde los microorganismos no pueden desarrollarse debido a la alta toxicidad de los contaminantes. Por ejemplo, se emplea la enzima peroxidasa para iniciar la degradación de fenoles y aminas aromáticas presentes en aguas residuales de muchas industrias.²³

b. Remediación microbiana

En este tipo de remediación se usan microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Los microorganismos utilizados en biorremediación pueden ser los ya existentes (autóctonos) en el sitio contaminado o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser agregados o inoculados. La descontaminación se produce debido a la capacidad natural que tienen ciertos organismos de transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas. El hombre ha aprendido a aprovechar estos procesos metabólicos de los microorganismos. De esta forma, los microorganismos que pueden degradar compuestos tóxicos para el ambiente y convertirlos en compuestos inocuos o menos tóxicos, se aprovechan en el proceso de biorremediación. De esta forma, reducen la polución de los sistemas acuáticos y terrestres.²³

La gran diversidad de microorganismos existentes ofrecen muchos recursos para limpiar el medio ambiente, en la actualidad, esta área está siendo objeto de intensa investigación. Existen, por ejemplo, bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, acetona, pesticidas, herbicidas, ésteres, alcoholes simples, entre otros. Los metales pesados como uranio, cadmio y mercurio no son biodegradables, perolas bacterias pueden concentrarlos de tal manera de aislarlos para que sean eliminados más fácilmente. Las actividades microbianas en el proceso de biorremediación se pueden resumir en el siguiente esquema.²³

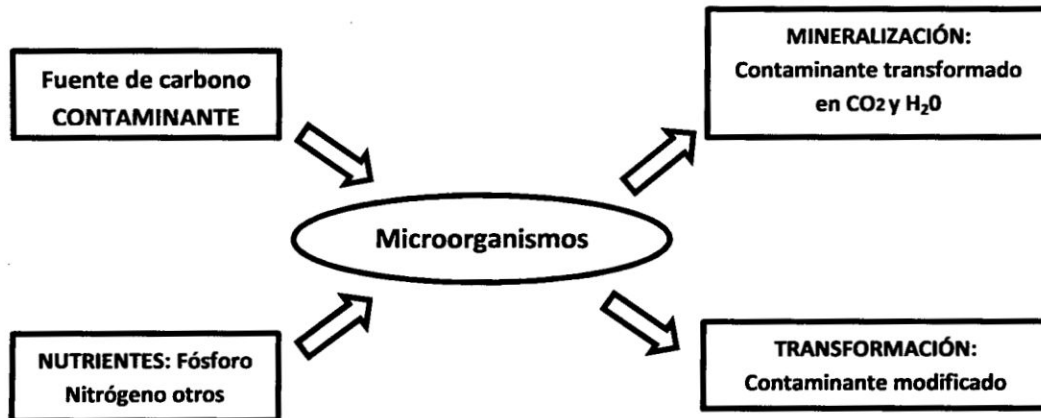


Figura 4. Metabolismo microbiano de contaminantes.²³

2.3.2. DEGRADACIÓN MICROBIANA DE PLAGUICIDAS

Durante muchos años se creía que los mecanismos de degradación de los plaguicidas eran similares en animales y en microorganismos. Pero con el avance de las investigaciones se apreciaron las diferencias, en animales se da una conversión de éstos compuestos de forma que puedan ser excretables, éste proceso se da principalmente en el hígado. En microorganismos su utilización es por el contrario una forma de obtención de energía o fuente de carbono.

Las vías metabólicas son muy variadas: fermentaciones, respiraciones anaeróbicas, acción de exoenzimas y quimiolitótrofos. Existen dos formas por la que la cual la microbiota puede degradar el plaguicida.

- La sustancia favorece el crecimiento microbiano y es empleada como fuente de carbono, energía y raras veces como fuente de nitrógeno, azufre, etc. El número de microorganismos aumenta y el aislamiento se realiza utilizando el plaguicida como única fuente de nutrientes. Luego de que el compuesto fue degradado las poblaciones decrecen.
- Por cometabolismo el compuesto no actúa directamente como fuente de nutrientes sino que se debe emplear otras como la glucosa, que al disminuir en el medio inducen las enzimas necesarias para la degradación del plaguicida.

Las reacciones catabólicas ocurren principalmente cuando las dosis de pesticidas son altas y la estructura química permite su degradación. Alexander²⁴, indica una serie de reacciones que pueden ser realizadas por microorganismos heterótrofos sobre los plaguicidas:

- a. **Detoxificación.**- Conversión de una molécula tóxica en otra no tóxica (*Arthrobacter spp*).
- b. **Degradación.**- Transformación de una sustancia compleja en productos más simple, ejemplo la mineralización que da como resultado la aparición de CO₂, H₂O, NH₃, etc. (*Pseudomonas spp*).
- c. **Conjugación.**- Formación de compuestos por reacciones de adición, en donde el microorganismo combina el plaguicida con metabolitos celulares (adición de aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.).

La degradación de plaguicidas clorados que se produce en ambientes anóxicos y óxicos, donde la degradación anóxica está ligada a la de cloración reductora de la molécula, siendo el derivado sin cloro mucho menos tóxico que la molécula original clorada.

2.3.3. USO DE HONGOS EN LA BIORREMEDIACIÓN

Algunos géneros de microorganismos usan pesticidas como substratos ya sea co-metabolizando las moléculas o usando éstas como nutrientes. El suelo como ecosistema, incluye grupos microbianos, animales invertebrados y vertebrados, así como a los constituyentes orgánicos e inorgánicos. El medio ambiente edáfico es único en diferentes aspectos, contiene gran variedad de bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios; es uno de los sitios más dinámicos de interacciones biológicas en la naturaleza; en el cual se realizan la mayor parte de las reacciones bioquímicas involucradas en la descomposición de la materia orgánica, y la nutrición de cultivos agrícolas. En suelos aireados adecuadamente, predominan bacterias y hongos, mientras que en los ambientes que contienen poco o nada de oxígeno únicamente las bacterias.²⁴

La aplicación de hongos para la limpieza de contaminantes se ha mostrado prometedor desde 1985, cuando se encontró que la pudrición blanca con *Phanerochaete chrysosporium*, es capaz de metabolizar un número de importantes contaminantes ambientales.²⁵ Esta capacidad se atribuye generalmente a la degradación enzimática sistema de lignina del hongo, y una capacidad degradante similares, más tarde fue descrito para la otra pudrición blanca hongos, 4 hongos de pudrición blanca poseen una serie de ventajas que pueden ser explotados en los sistemas de biorremediación. Dado que los componentes clave de su sistema de lignina-degradantes son extracelulares, estos hongos pueden degradar productos químicos insolubles tales como lignina

o un rango muy diverso de contaminantes ambientales muy persistentes o tóxicos.⁹

El hábito de crecimiento micelial también es ventajosa, ya que permite una rápida colonización de sustratos, y la extensión de las hifas permite la penetración de contaminantes que llegan del suelo en formas que otros organismos no pueden hacer.²⁶ Esto puede maximizar el contacto físico, mecánico y enzimático con el medio ambiente circundante.²⁷ Además, estos hongos utilizan materiales lignocelulósicos baratas y abundantes como una fuente de nutrientes. Ellos pueden tolerar una amplia gama de condiciones ambientales, tales como los niveles de temperatura, el pH y la humedad²⁷ y no requieren pre-acondicionado a un contaminante en particular, debido a que su sistema de degradación es inducida por la privación de nutrientes.⁹

Tabla 3. Géneros de microorganismos heterótrofos que usan pesticidas.

Bacterias	Actinomicetos	Hongos
<i>Agrobacterium</i>		<i>Alternaria</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Flavobacterium</i>		<i>Glomerella</i>
<i>Klebsiella</i>		<i>Mucor</i>
<i>Pseudomonas</i>		<i>Penicillium</i>
<i>Xantomonas</i>		<i>Rhizoctonia</i>
<i>Clostridium</i>		<i>Trichoderma</i>

Fuente: Madigan et al.²⁸

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CARACTERÍSTICAS DE ZONA DE ESTUDIO

Zona de muestreo	: Distrito de Santa Rosa-VRAEM.
Ubicación	: 12°41'22" latitud sur y 73°44'06" longitud oeste.
Clima	: Cálido húmedo.
Temperatura	: Máxima 30°C, mínima 19°C y media 25°C.
Zona de vida	: Bosque muy húmedo subtropical
Altitud	: 708 msnm.
%HR	: 85%
pH del suelo	: 4,5 – 5,5
Características	: Suelo arcilloso

3.2. TOMA DE MUESTRA

1. Los criterios de toma de muestra fueron: Suelos con mayor y constante asistencia de insecticidas, zonas de mayor producción de "cacao" y "coca".^{29,30}
2. Se demarcó un área de 100 cm² (10 x 10 cm) en la parte central y baja del terreno, donde se tomaron las muestras.
3. Se retiró la capa superficial de tierra de unos 10 a 15 cm, con ayuda de una paleta desinfectada.
4. Se tomó aproximadamente 1000 g de suelo, entre los 10 y 20 cm de profundidad, luego se introdujo en una bolsa de polietileno nueva.
5. Las muestras fueron trasladadas en un "cooler" a una temperatura aproximada de <10 °C al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH para su procesamiento.

3.3. METODOLOGÍA Y RECOLECCIÓN DE DATOS

3.3.1. Determinación de las concentraciones de carbofurán que presentan mejor crecimiento de hongos

1. Se tamizaron las muestras de suelo recolectadas, con malla de 2 x 2 mm para separar las piedras y partículas grandes.
2. Se pesó 10 g de suelo tamizado, luego se realizó una dilución de 10^{-1} con agua peptonada estéril como diluyente.
3. 1,0 mL de la dilución se inoculó a frascos conteniendo 100 mL de caldo Busnell Hass³¹ más antibiótico (oxitetraciclina)³² a los que se añadió 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/l de carbofurán¹² en cada frasco.
4. Se incubó en agitación horizontal por 15 días a temperatura de 25 °C.
5. Se realizó la siembra en placa de cada uno de los frascos de ensayo mediante la técnica de incorporación con agar Sabouraud por 14 días a 25 °C.
6. Se cuantificaron el número de colonias y se determinaron las concentraciones óptimas de carbofurán en las que hubo mayor crecimiento de hongos.

Tabla 4. Composición del ensayo para la determinación de las concentraciones de carbofurán que presentan mejor crecimiento de hongos. Santa Rosa-VRAEM; Ayacucho 2014.

Nº	Código	Composición del medio	Vol. final
1	10-BH-H	Medio mineral Busnell Hass + 10 mg/l plaguicida + 1,0 ml de inóculo	100 ml
2	20-BH-H	Medio mineral Busnell Hass + 20 mg/l plaguicida + 1,0 ml de inóculo	100 ml
3	30-BH-H	Medio mineral Busnell Hass + 30 mg/l plaguicida + 1,0 ml de inóculo	100 ml
4	40-BH-H	Medio mineral Busnell Hass + 40 mg/l plaguicida + 1,0 ml de inóculo	100 ml
5	50-BH-H	Medio mineral Busnell Hass + 50 mg/l plaguicida + 1,0 ml de inóculo	100 ml
6	60-BH-H	Medio mineral Busnell Hass + 60 mg/l plaguicida + 1,0 ml de inóculo	100 ml
7	BH-H	Medio mineral Busnell Hass + 1,0 ml de inóculo	100 ml
8	BH	Medio mineral Busnell Hass	100 ml

3.3.2. Aislamiento de hongos degradadores de carbofurán

1. A partir de las concentraciones óptimas de crecimiento, los hongos fueron repicadas en Agar Busnell Hass más antibiótico a los que se añadió 30 mg/l de carbofurán^{31,32} con el propósito de tener un control de colonias puras con las mismas concentraciones en que fueron aisladas.
2. Se incubó por 15 días a temperatura de 25 °C.
3. Las colonias puras, fueron repicadas en ceparios para su estudio y formación del consorcio de hongos.
4. Las cepas que formaron el consorcio de hongos fueron sembrados en tubos de 13 mm x 100 mm en agar Sabouraud, se incubaron por 15 días a temperatura de 25 C° para la producción de esporas.

3.3.3. Curva patrón para la determinación de carbofurán

a) Preparación de la solución de carbofurán

- Se preparó 100 ml de solución de diferentes concentraciones conocidas de carbofurán utilizando agua destilada, teniendo en cuenta las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 mg/l de carbofurán.
- Enseguida se tomó 1 ml de solución y se transfirió en un tubo de ensayo de 18 mm x 150 mm.
- Se procedió a añadir un 0,5 ml de metanol absoluto, luego con 25 µl de hidróxido de sodio 2 M.

b) Preparación de la solución de "Dapsona"

- Se pesó 0,05 g de "DAPSONA" (4,4-diaminodifenilsulfona), luego se disolvió con 1,25 ml de ácido clorhídrico 1M.
- Se agregó 0,25 ml de nitrito de sodio 1,0 % y en seguida se llevó a 25 ml con agua destilada.
- Finalmente se procedió a mantener la solución en 5 °C por 3 minutos en constante agitación.

c) Reacción cromogénica de carbofurán

- En un tubo de ensayo de 18 mm x 150 mm se agregó 1 ml de solución de carbofurán anteriormente preparados, luego se adicionó 0,5 ml de la solución de "DAPSONA".

- En seguida se homogenizó hasta que tomó una coloración anaranjada.
- Luego se procedió a realizar la lectura a 480 nm de longitud de onda³³ en el Espectrofotómetro *UV-Visible Thermo Scientific GENESYS 10*, previamente usando como blanco agua destilada.
- Con los valores obtenidos se procedió a determinar la curva de patrón estandarizada.

3.3.4. Evaluación de la capacidad degradadora de carbofurán

a) Preparación del inóculo

- Se cosechó esporas por cada cepa aislada en tubos de 13 mm x 100 mm con 5 ml de solución salina fisiológica hasta llegar a una escala de Mcfarland N° 05.
- Se tomó 1,0 ml de cada aislamiento estandarizado y se inoculó en frascos de prueba de 16 x 150 mm conteniendo 100 ml de Caldo BH con 10, 20 y 30 mg/l de carbofurán respectivamente con tres repeticiones (ensayos problema).
- Se estableció frascos de control negativo, al que se añadió 10, 20 y 30 mg/l de carbofurán a los cuales no se inoculó ninguna cepa (ensayo blanco) y por último un frasco con 100 ml de caldo mineral Busnell Hass.
- Se incubó en agitación constante a temperatura de 25°C durante 30 días.
- A partir del día cero, cada 5 días durante 30 días, se determinó la concentración de carbofurán en cada uno de los frascos de ensayo mediante la técnica cromogénica de "Dapsona".³³

b) Determinación de la capacidad degradadora de carbofurán

- A partir de cada uno de los frascos en incubación, se tomó 1 ml de muestra debidamente homogenizado, luego se transfirió a un tubo de ensayo de 18 mm x 150 mm en condiciones asépticas.
- Se procedió a centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos para separar el sobrenadante de la biomasa microbiana.
- Se agregó 0,5 ml de metanol absoluto más 50 µl de hidróxido de sodio 2 M y se homogenizó.

- Se tomó 1 ml de la solución de carbofurán (solución problema) y se transfirió a otro tubo de ensayo 18 mm x 150 mm. Luego se adicionó 0,5 ml de solución de Dapsona previamente preparados.
- Enseguida se homogenizó hasta la formación de una coloración naranja.
- Se realizó la lectura a 480 nm³³ con el Espectrofotómetro *UV-Visible Thermo Scientific Serie GENESYS 10*, previamente usando como blanco agua destilada.
- Con los valores de la lectura se determinó la cantidad de carbofurán degradado por el consorcio de hongos, estableciendo ecuaciones y gráficos estadísticos en relación a la curva patrón estandarizado.

3.4. ANÁLISIS DE DATOS

Para evaluar las diferencias significativas en la variabilidad de los datos de los ensayos de biodegradación con consorcios de hongos aislados a partir de suelos de cultivos de “cacao” y “coca”, con 10 mg/l, 20 mg/l y 30 mg/l de carbofurán, se procedió a realizar el análisis estadístico mediante el análisis de varianza a un nivel de confianza del 95%.

3.5. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DEGRADADORAS DE CARBOFURÁN

a) Caracterización cultural

Los hongos aislados a partir de suelos agrícolas con cultivos de “cacao” y “coca” fueron caracterizados y diferenciados mediante sus características culturales con la utilización de tres medios de cultivos diferentes; agar Sabouraud, agar papa dextrosa y agar harina de maíz.

b) Identificación microscópica

La identificación microscópica se hizo mediante la técnica de microcultivo, con la ayuda de la descripción macroscópica o cultural se identificó las distintas cepas de hongos aisladas con la ayuda de claves pictóricas e información bibliográfica.³⁴⁻⁴⁰

IV. RESULTADOS

Tabla 5. Valores de recuento del número de colonias en el ensayo de determinación de la concentración de carbofurán que presentan mejor crecimiento de hongos. Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2014.

ENSAYO	Concentración de carbofurán	UFC/ml	
		Hongos de suelos de cultivo de "Cacao"	Hongos de suelos de cultivo de "Coca"
10-BH-H	10 mg/l	48	34
20-BH-H	20 mg/l	39	36
30-BH-H	30 mg/l	32	28
40-BH-H	40 mg/l	22	16
50-BH-H	50 mg/l	11	13
60-BH-H	60 mg/l	12	8
BH-H	-	54	38
BH	-	-	-

Tabla 6. Número de cepas que forman el consorcio de hogos aislados a partir de suelos agrícolas de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" y *Erythroxylum coca* "coca". Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2014.

Consortio	Nº de cepas
"Cacao"	12
"Coca"	6
Total	18

Tabla 7. Valores de estandarización de la curva patrón para la cuantificación de carbofurán. Ayacucho 2014.

Nº	CARBOFURAN [mg/l]	ABS. OBTENIDA	ABS. CORREGIDA	ECUACIÓN OBTENIDA
1	1 mg/l	0,115	0,107	
2	5 mg/l	0,157	0,1898	
3	10 mg/l	0,269	0,2933	
4	15 mg/l	0,394	0,3968	$Y = 0,0207X + 0,0863$ $R^2 = 0,9961$
5	20 mg/l	0,513	0,5003	
6	25 mg/l	0,650	0,6038	
7	30 mg/l	0,703	0,7073	ECUACIÓN CORREGIDA
8	35 mg/l	0,823	0,8108	
9	40 mg/l	0,916	0,9143	
10	45 mg/l	1,018	1,0178	$Y = 0,0207X + 0,0863$ $R^2 = 1$
11	50 mg/l	1,159	1,1213	
12	55 mg/l	1,204	1,2248	
13	60 mg/l	1,291	1,3283	

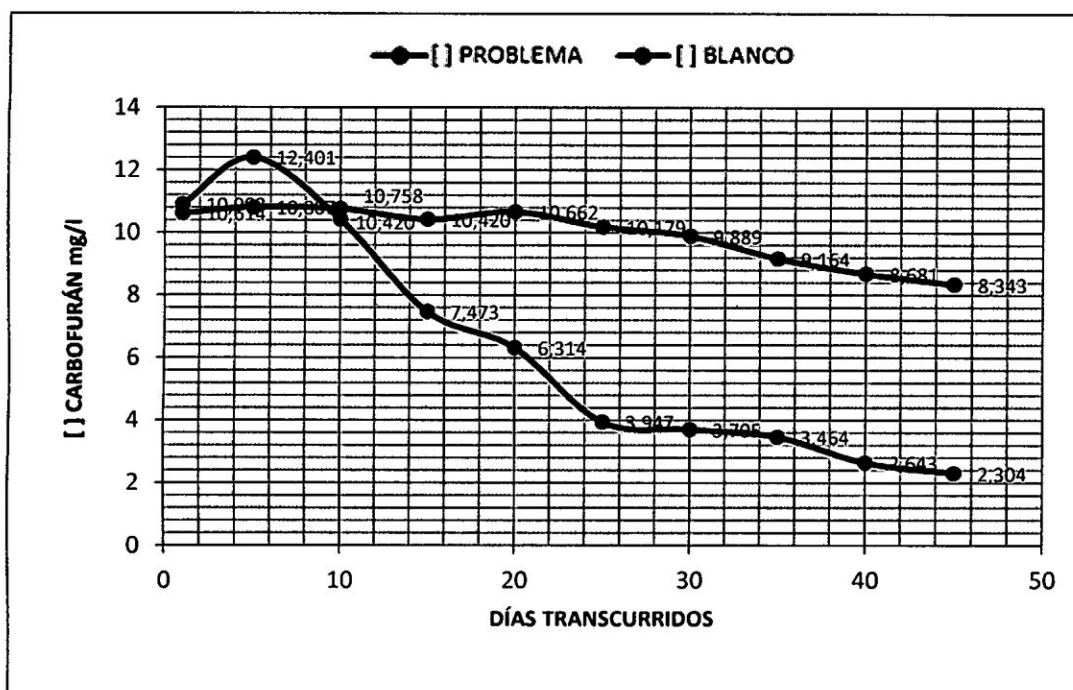


Figura 5. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 10 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

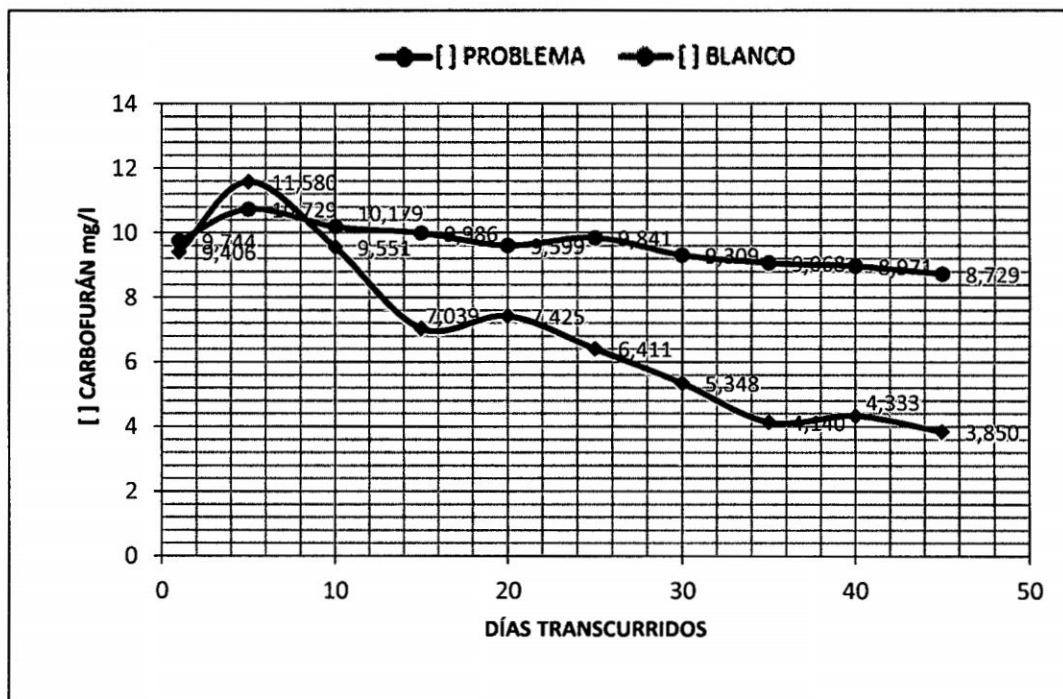


Figura 6. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 10 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

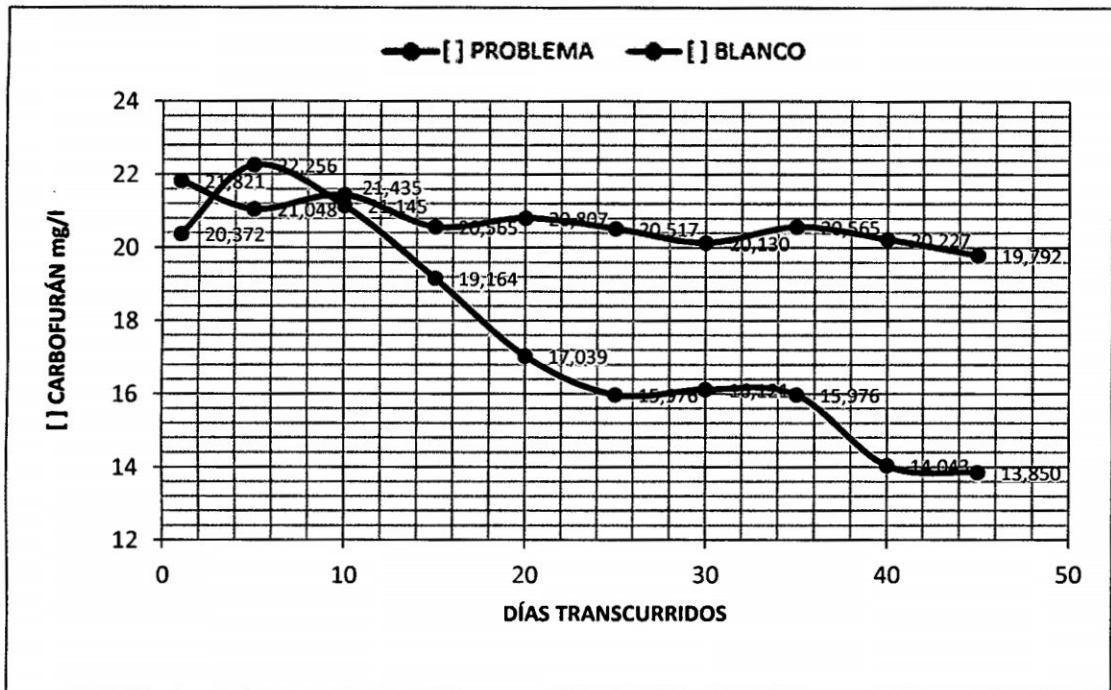


Figura 7. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 20 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

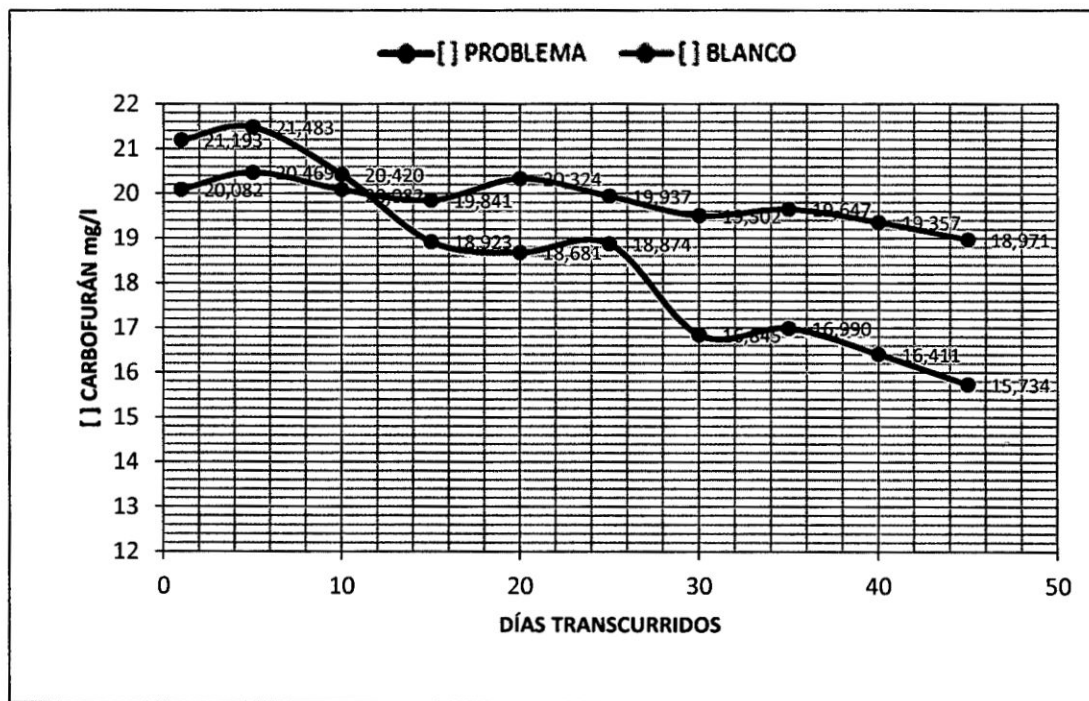


Figura 8. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 20 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

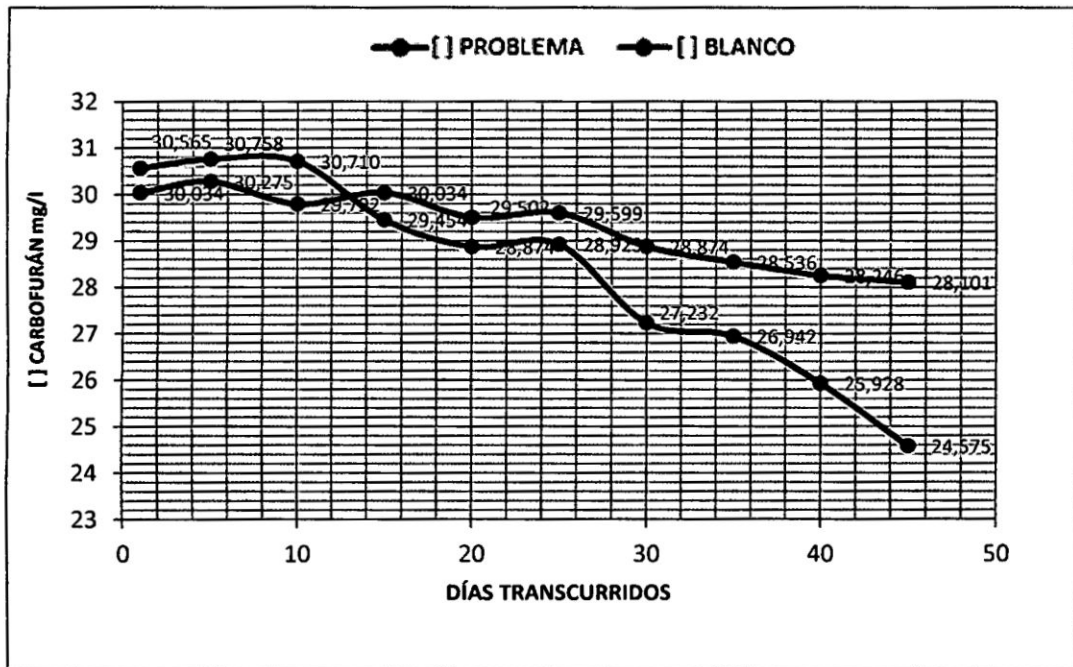


Figura 9. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 30 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

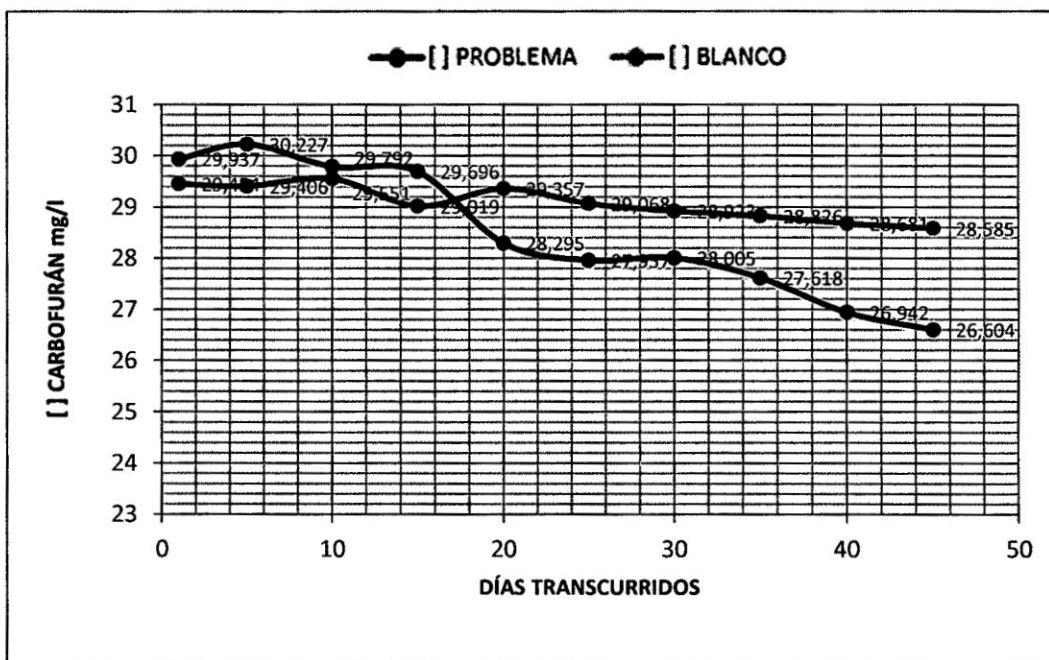


Figura 10. Biodegradación de carbofurán a una concentración inicial de 30 mg/l por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

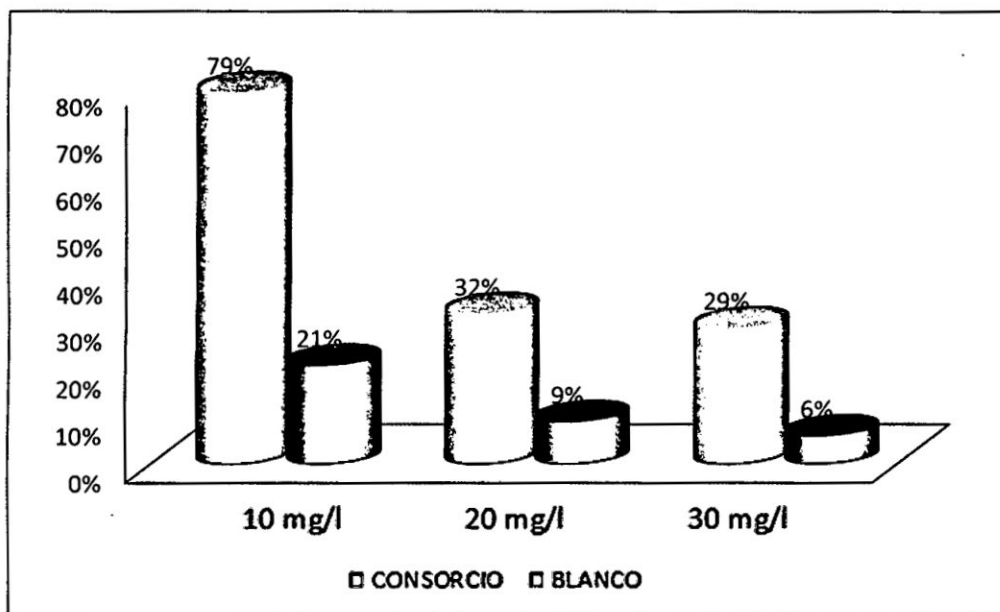


Figura 11. Porcentaje de biodegradación del carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" en relación a diferentes concentraciones de carbofurán. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

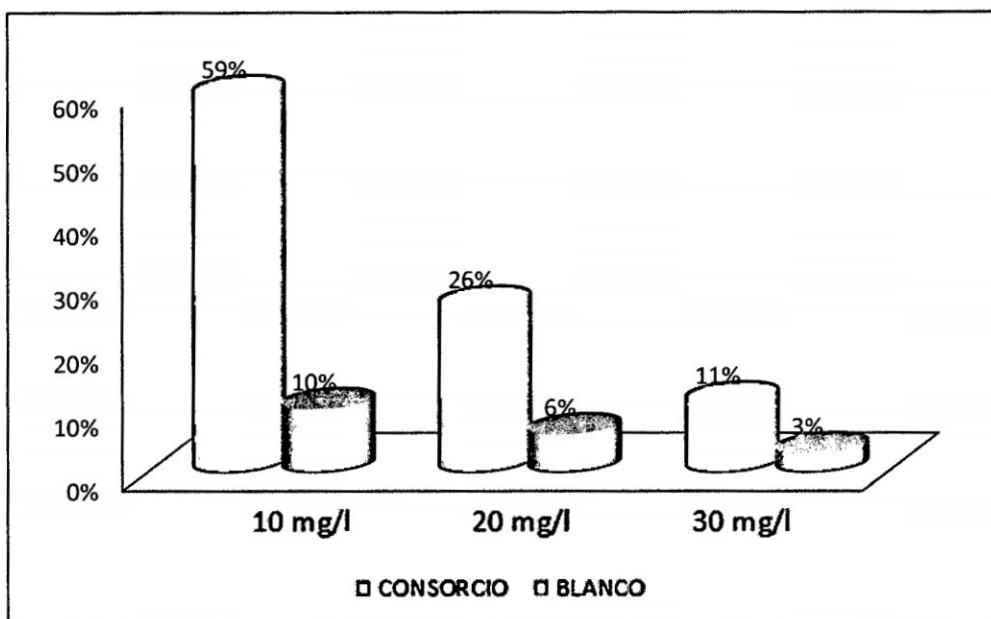


Figura 12. Porcentaje de biodegradación del carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca" en relación a diferentes concentraciones de carbofurán. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

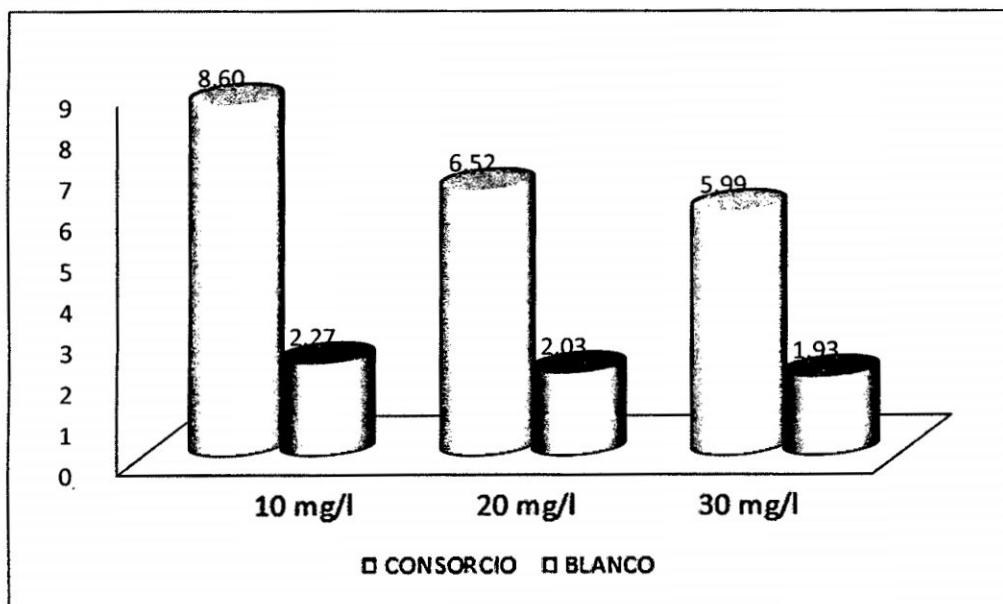


Figura 13. Cantidad total de carbofurán degradado por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" en relación a diferentes concentraciones de carbofurán. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

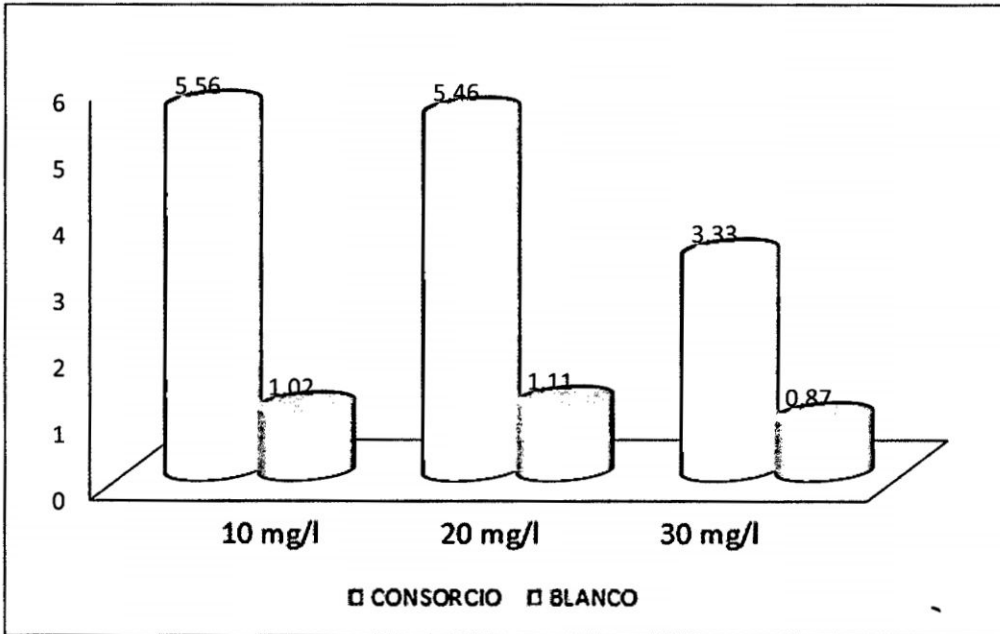


Figura 14. Cantidad total de carbofurán degradado por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca" en relación a diferentes concentraciones de carbofurán. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.

Tabla 8. Valores de análisis de varianza de la biodegradación de carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" a diferentes concentraciones. Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2014.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4404,164	5	880,833	180,731	,000
Intra-grupos	263,182	54	4,874		
Total	466,346	59			

Tabla 9. Valores de análisis de varianza de la biodegradación de carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca" a diferentes concentraciones. Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2014.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4269,088	5	853,818	382,073	,000
Intra-grupos	120,674	54	2,235		
Total	4389,761	59			

Tabla 10. Características culturales del consorcio de hongos, aislados de suelos con cultivos de *Theobroma cacao* "cacao", con capacidad biodegradadora de carbofurán mostradas en tres tipos de medio de cultivo. Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2014.

CEPA	MEDIO	CARACTERÍSTICAS CULTURALES
I-5	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa plana circular de color marrón-amarillo con el tiempo pulverulentas, reverso marrón.
	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa plana circular de color marrón-amarillo con bordes blancos, reverso marrón.
	Agar harina de maíz	Colonia algodonosa planas circular de crecimiento lento.
I-6	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa circulares flocosa de colora blanco con pigmentaciones marrones, reverso marrón con manchas oscuras.
	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa plana, borde color blanco con elevación circular, centro amarillo, reverso marrón con bordes blancos.
	Agar harina de maíz	Colonia plana algodonosa de color blanco con crecimiento blanco.
I-7	Agar Sabouraud	Colonia de inicio plana y flocosa de color blanco que con el tiempo se volvieron aterciopeladas o pulverulentas, de color rosado.
	Agar papa dextrosa	Colonia de inicio plana y flocosa de color blanco que con el tiempo se vuelven algodonosa, de color rosado.
	Agar harina de maíz	Colonia de inicio plana y flocosa de color blanco que con el tiempo mantienen sus características.
I-8	Agar Sabouraud	Colonia plana aterciopelada algodonosa de color rosado, reverso color marrón.
	Agar papa dextrosa	Colonia planas no algodonosa de color marrón, no aterciopelada.
	Agar harina de maíz	Colonia plana y blanca no aterciopelada con crecimiento lento.
I-9	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa circular flocosa de colora blanco con pigmentaciones marrones, reverso marrón con manchas oscuras.
	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa plana, borde color blanco con elevación circular, centro amarillo, reverso marrón con bordes blancos.
	Agar harina de maíz	Colonia plana algodonosa de color blanco con crecimiento lento.
I-11	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa circular de color rosado aterciopelado con borde circular de color oscuro , reverso circular color marrón, centro oscuro, borde definido de color marrón .
	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa circular de color marrón No aterciopelado, borde con doble elevación circular, reverso: centro marrón con lados oscuros borde marrón circular.
	Agar harina de maíz	Colonia algodonosa de color blanco circular con borde con doble elevación circular, reverso circular y doble circunferencia blanco.
I-12	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa plana circular de color marrón-amarillo con el tiempo pulverulentas, reverso marrón.
	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa plana circular de color marrón-amarillo con bordes blancos, reverso marrón.
	Agar harina de maíz	Colonia algodonosa plana circular de crecimiento lento.
I-13	Agar sabouraud	Colonia plana aterciopeladas algodonosas de color rosado, reverso color marrón.
	Agar papa dextrosa	Colonia plana no algodonosas de color marrón, no aterciopelada.
	Agar harina de maíz	Colonia plana y blanca no aterciopeladas con crecimiento lento.

	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa circular de color rosado aterciopelado con borde circular de color oscuro , reverso circular color marrón, centro oscuro, borde definido de color marrón.
I-14	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa circular de color marrón No aterciopelado, borde con doble elevación circular, reverso: centro marrón con lados oscuros borde marrón circular.
	Agar harina de maíz	Colonia algodonosa de color blanco circular con borde con doble elevación circular, reverso circular y doble circunferencia blanco.
I-15	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa plana circular de color marrón-amarillo con el tiempo pulverulento, reverso marrón.
	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa plana circular de color marrón-amarillo con bordes blancos, reverso marrón.
	Agar harina de maíz	Colonia algodonosa plana circular de crecimiento lento.
I-17	Agar Sabouraud	Colonia circular con elevación-negruczca crateriforme de crecimiento lento con borde marrón, reverso circular de color negruzco con borde marrón.
	Agar papa dextrosa	Colonia circular con elevación-negruczca crateriforme de crecimiento lento con borde blanco, reverso circular de color negro con borde blanco.
	Agar harina de maíz	Colonia de crecimiento muy lento de color negro.
I-19	Agar Sabouraud	Colonia gris, centro oscuro, aterciopeladas con bordes blancos, con el tiempo pulverulentas, Reverso color marrón aterciopelad.
	Agar papa dextrosa	Colonias grises, centro oscuro, No aterciopeladas con borde hundido y circular, con el tiempo pulverulentas, reverso color marrón-verduzco.
	Agar harina de maíz	Colonia gris-verduzca, con borde blanco de crecimiento lento y pulverulentas.

Tabla 11. Características culturales del consorcio de hongos, aislados de suelos con cultivos de *Erythroxylum coca* "coca", con capacidad biodegradadora de carbofurán mostradas en tres tipos de medio de cultivo. Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2014.

CEPA	MEDIO	CARACTERÍSTICAS CULTURALES
II-1	Agar Sabouraud	Colonia plana aterciopelada con borde blancos definidos centro marrón oscuro, reverso color marrón aterciopelado.
	Agar papa dextrosa	Colonias planas, aterciopeladas centro marrón claro con lados circulares marrón oscuro , bordes color amarillo oscuro, reverso centro blanco con lados circulares marrón oscuro borde amarillos aterciopelado.
	Agar harina de maíz	Colonia plana de crecimiento lento color marrón con bordes elevados.
II-3	Agar Sabouraud	Colonia blanca algodonosa flocosa circular aterciopelada con el tiempo con bordes amarillo-verdoso pulverulenta, reverso color marrón con bordes blancos.
	Agar papa dextrosa	Colonia verde algodonosa flocosa circular aterciopeladas con borde amarillo pulverulentas, reverso marrón claro.
	Agar harina de maíz	Colonia plana verduzca pulverulentas de crecimiento lento.
II-4	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa de color rosado semi-aterciopelada, reverso circular de color marrón.
	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa de color rosado, reverso circular marrón.
	Agar harina de maíz	Colonia circular blanco con bordes de doble elevación circular de crecimiento lento.
II-5	Agar Sabouraud	Colonia blanca algodonosa flocosa circular aterciopeladas con el tiempo con bordes amarillo-verdoso pulverulentas, reverso color marrón con bordes blancos.
	Agar papa dextrosa	Colonia verde algodonosa flocosa circular aterciopeladas con borde amarillo pulverulentas, reverso marrón claro.
	Agar harina de maíz	Colonia plana verduzca pulverulentas de crecimiento lento.
II-6	Agar Sabouraud	Colonia algodonosa aterciopelada centro de color marrón lado circular de color marrón oscuro bordes marrón claro, reverso de color marrón aterciopelados con bordes oscuros.
	Agar papa dextrosa	Colonia circular No aterciopelado, algodonoso, Cendro verduzco borde marrón, reverso circular centro marrón borde con doble coloración verduzco y marrón.
	Agar harina de maíz	Colonia circular de crecimiento lento y verduzco.
II-15	Agar Sabouraud	Colonia color plana aterciopelada con borde circular, reverso color marrón.
	Agar papa dextrosa	Colonia algodonosa y plana no aterciopelada borde circular, reverso color marrón.
	Agar harina de maíz	Colonia algodonosa plana de crecimiento lento.

Tabla 12. Identificación del consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" y *Erythroxylum coca* "coca" del distrito de Santa Rosa VREAM, Ayacucho 2014.

CONSORCIO	CÓDIGO	GÉNERO
"Cacao"	I-12	
	I-15	<i>Aspergillus sp</i>
	I- 5	
	I-17	
	I- 8	<i>Fusarium sp.</i>
	I-13	
	I-14	
	I-11	
	I- 9	<i>Paecilomyces sp.</i>
	I- 6	
	I- 7	
	I- 19	<i>Penicillium sp.</i>
"Coca"	II-15	<i>Aspergillus sp.</i>
	II-6	
	II-3	
	II-5	<i>Penicillium sp.</i>
	II-1	
	II-4	<i>Paecilomyces sp.</i>

V. DISCUSIÓN

Para tener mayor probabilidad de éxito en los aislamientos de hongos degradadores de xenobióticos, se estableció puntos de muestreo en sitios previamente expuestos a éstos contaminantes;^{12,41-43} por tanto, las áreas estratégicas de muestreo fueron suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa; donde la actividad agrícola, principalmente el cultivo de "coca", es alto en relación a otras actividades como el cultivo de "cacao"; por lo que, más del 90% de todos los agroquímicos que se utilizan en el VRAEM, principalmente los insecticidas, están destinados a la producción ilícita de "coca"^{29,30} tal es el caso, que los pesticidas derivados de los carbamatos como el carbofurán, cuyo nombre comercial es el "diafurán" que es el que se empleó en éste trabajo, es utilizado en la los cultivos de "coca";⁴⁴ es importante anotar que éste producto se encuentra en la categoría de "extremadamente peligroso".¹⁶ Por otra parte, la utilización constante de éstos pesticidas, hace que existan residuos de sustancias en tierras de cultivo, y entre en interacción con factores abióticos y bióticos hasta entrar en degradación.

Aun cuando carbofurán es extremadamente tóxico y difícil de degradar, la exposición prolongada de los hongos a éste genera su utilización por su sistema multienzimático que actúa en la biotransformación del pesticida.^{4,45} Lenavon (1993)⁴⁶, indica que la biodegradación de pesticidas en el suelo es llevada a cabo tanto por hongos y bacterias, y en la que comprueba la mineralización de cuatro pesticidas entre ellos; el carbofurán. Con referencia a éstos estudios se planteó el ensayo de aislamiento de hongos degradadores de carbofurán en torno a los diseños establecidos por Chuchón (2013)¹², Mendoza *et al.* (2011)⁴⁷ y Castrejón *et al.* (2009)⁴⁸ que como complemento se utilizó un antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias y favorecer el desarrollo de los hongos con la

composición y condiciones de cultivo referentes a la concentración de carbofurán (Tabla 4).^{31,32}

En la Tabla 5, muestra los valores del recuento de carga microbiana en los ensayos de determinación de la concentración de carbofurán que presentan mejor crecimiento de hongos realizados mediante la técnica de recuento estándar en placa en agar sabouraud a los 15 días de incubación. Los detalles de los valores obtenidos permitió tener referencia sobre la concentración del carbofurán con la que se trabajó en los aislamientos en medio sólido; de tal manera, que no exista la inhibición por sustrato (carbofurán) ni mucho menos déficits en nutrientes durante el periodo de incubación.¹² Los resultados en los ensayos 10-BH-H, 20-BH-H y 30-BH-H fueron 48 UFC/ml, 39 UFC/ml y 32 UFC/ml respectivamente, que hacen referencia al aislamiento a partir de suelos con cultivos de "cacao"; mientras que los resultados del aislamientos a partir de suelos con cultivos de "coca" fueron 34 UFC/ml, 36 UFC/ml y 28 UFC/ml respectivamente, observándose un mayor número de UFC/ml de hongos en el aislamiento a partir de suelos con cultivo de "cacao". Respecto a éstos resultados, los ensayos 10-BH-H, 20-BH-H y 30-BH-H que corresponden a las concentraciones de 10 mg/l, 20 mg/l y 30 mg/l de carbofurán respectivamente en caldo Busnell Hass; fueron mayores con respecto a los tres últimos ensayos que presentan mayor concentración de carbofurán, evidenciando que a mayor concentración del pesticida influye en el desarrollo de las colonias; que además, está influenciado por la toxicidad del pesticida (carbofurán).⁴⁹ En torno a ello, como a los requerimientos nutricionales²⁸ y el tiempo de incubación para el aislamiento en medio sólido;¹² la concentración de 30 mg/l de carbofurán, fué seleccionada como concentración óptima para su posterior utilización en el enriquecimiento de agar Busnell Hass, para así favorecer y mantener la capacidad multienzimática de los hongos⁴ en la degradación del carbofurán, que luego, fueron repicadas en ceparios (Figura 24) para la conformación del consorcio, identificación y utilización en la formación de esporas.

En los gráficos 5 y 6 muestran los valores de biodegradación mediante hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de "cacao" y "coca" respectivamente con los ensayos problema y valores de los ensayos blanco en relación al tiempo iniciando a una concentración referente de 10 mg/l de carbofurán, donde a medida que transcurre el tiempo las concentraciones de carbofurán en el ensayo problema comenzaron a reducir hasta 2,304 mg/l de carbofurán (Figura 5) que

corresponde al ensayo de biodegradación con hongos aislados de suelos agrícolas con cultivo de "cacao" y hasta 3,850 mg/l de carbofurán (Figura 6) que corresponde al ensayo con hongos aislados de suelos agrícolas con cultivo de "coca". Mientras que en el ensayo blanco la reducción es mínima que llega hasta 8,343 mg/l de carbofurán y 8,729 mg/l de carbofurán correspondientes a los ensayos de "cacao" y "coca" respectivamente. Al comparar éstos resultados se observa que la actividad biodegradadora del consorcio de hongos ha logrado reducir 8,60 mg/l y 5,56 mg/l de carbofurán (Figura 13 y 14) que equivale a 79% y 59% de degradación (Figura 11 y 12) respecto a la concentración inicial referentes a los ensayos con hongos aislados de suelos con cultivos de "cacao" y "coca" respectivamente, presentando resultados similares a los resultados obtenidos por chuchón (2013)¹², referentes a una concentración inicial de 10 mg/l de carbofurán mediante la utilización de consorcios bacterianos.

Las figuras 7 y 8 muestran los valores de biodegradación mediante hongos aislados de suelos agrícolas de cultivos de "cacao" y "coca" respectivamente con los ensayos problema y valores de los ensayos blanco en relación al tiempo iniciando a una concentración referente de 20 mg/l de carbofurán, donde a medida que transcurre el tiempo las concentraciones de carbofurán en el ensayo problema comenzaron a reducir hasta 13,850 mg/l de carbofurán (Figura 7) que corresponde al ensayo de biodegradación con hongos aislados de suelos agrícolas con cultivo de "cacao" y hasta 15,734 mg/l de carbofurán (Figura 8) que corresponde al ensayo con hongos aislados de suelos agrícolas con cultivo de "coca". Mientras que en el ensayo blanco la reducción llega hasta 19,792 mg/l y 18,971 mg/l de carbofurán correspondientes a los ensayos de "cacao" y "coca" respectivamente. Al comparar éstos resultados se observa que la actividad biodegradadora del consorcio de hongos ha logrado reducir 6,52 mg/l y 5,46 mg/l de carbofurán (Figura 13 y 14) que equivale a 32% y 26% de degradación (Figura 11 y 12) respecto a la concentración inicial referentes a los ensayos con hongos aislados de suelos con cultivos de "cacao" y "coca" respectivamente.

En gráficos 9 y 10, muestran los valores de biodegradación inician a una concentración referente de 30 mg/l de carbofurán, donde a medida que transcurre el tiempo las concentraciones de carbofurán en el ensayo problema comenzaron a reducir hasta 24,575 mg/l de carbofurán (Figura 9) que corresponde al ensayo de biodegradación con hongos aislados de suelos agrícolas con cultivo de "cacao" y hasta 26,604 mg/l de carbofurán (Figura 10) que corresponde al

ensayo con hongos aislados de suelos agrícolas con cultivo de "coca". Mientras que en el ensayo blanco la reducción es mínima que llega hasta 28,101 mg/l y 28,585 mg/l de carbofurán correspondientes a los ensayos de "cacao" y "coca" respectivamente. Al comparar éstos resultados se observa que la actividad biodegradadora del consorcio de hongos es muy mínima logrando reducir sólo 5,99 mg/l y 3,33 mg/l de carbofurán (Figura 13 y 14) que equivale a 29% y 3.33% de degradación (Figura 11 y 12) respecto a la concentración inicial referentes a los ensayos con hongos aislados de suelos con cultivos de "cacao" y "coca" respectivamente.

En base a los resultados obtenidos, se muestra que en todos los ensayos blanco existe una cierta disminución de los valores en la concentración de carbofurán respecto a la concentración inicial; sin duda, los fenómenos de degradación no son exclusivos por fenómenos biológicos, ya que, existen fenómenos abióticos involucrados. Éstos valores de disminución en la concentración de carbofurán en los ensayos blanco, que también fueron observados por Chuchón (2013)¹², se basa en los planteamientos establecidos por Johnson (1998)⁵⁰ y Jones(1998)⁵¹; quienes hacen énfasis al primer proceso de degradación del carbofurán debido a reacciones de hidrólisis química o física; mientras, Stoorvogel *et al.* (2003)⁵², menciona que la degradación de carbofurán es por procesos de óxido-reducción; de igual manera, Chuchón (2013)¹² hace mención a Ajona y Vidal (2000)⁵³, quienes describen la degradación de carbofurán por procesos fisicoquímicos con fenómenos de fotocatalisis solar y volatilización, que para éste trabajo, se tomó en cuenta dichos planteamientos; por lo que, se evitó la exposición a la luz en los ensayos de biodegradación.

En un enfoque a los gráficos de biodegradación (Figura 5 hasta la Figura 10) se observa que los valores de la concentración de carbofurán en los ensayos de biodegradación con hongos aislados a partir de suelos con cultivo de "cacao" son menores en respecto a los valores en el ensayo con hongos aislados a partir de suelos con cultivo de "coca"; no obstante, Chuchón (2013)¹², Grady (1985)⁴¹, Ortiz-Hernandez *et al.* (2010)⁴² y Carillo *et al.* (2004)⁴³; sostienen que los valores de biodegradación son significativos cuando un consorcio de microorganismos es aislado de una zona con constante aplicación de un pesticida o productos similares; sin embargo, existe una cierta contradicción en relación a los resultados de éste trabajo, ya que, se esperaba resultados de biodegradación más significativos en el ensayo con hongos aislados a partir de suelos con

cultivo de "coca", donde, la utilización de pesticidas es más prevalente en estos cultivos⁴⁴. Sobre las bases de las ideas expuestas, el motivo por el cual se obtuvo éstos resultados, fue porque el aislamiento de hongos que conformaron el consorcio de hongos a partir de suelos con cultivos de "coca" fueron menores en comparación a los consorcio de hongos aislados de suelos con cultivo de "cacao" (Tabla 6); éstos resultados van acorde a los planteamientos por Caplan (1993)⁵⁴, Furukawa (2003)⁵⁵ y Liu (1993)⁵⁶ quienes mencionan que no todos los hongos presentan una previa adaptación al medio y a los contaminantes que van a degradar, por lo que, en un suelo contaminado solo estarán presentes aquellos hongos que presentan capacidades biodegradativas. Por otro lado, las razones por lo que hubo resultados más significativos en el ensayo con hongos aislado a partir de suelos con cultivos de "cacao" se basa en los planteamientos de Maloney (2004)²⁷ y Reddy (2001)²⁶; donde, mencionan que a mayor cantidad de inóculo; favorece un mayor crecimiento micelial, permitiendo una rápida colonización al sustratos, ya que, la extensión de las hifas permite la penetración al contaminante; maximizando el contacto físico, mecánico y enzimático con el medio. Además, cabe mencionar que otros factores muy lejanos a ser controlados en éste estudio pudieron estar involucrados en los resultados, tal como plantea Ortiz (2010)⁴²; quien menciona que la biodegradación de los plaguicidas también depende de múltiples factores como: condiciones ambientales abióticas (temperatura, humedad, pH, nutrientes, etc.), comunidad microbiana (especie y relación entre ellos), características del pesticida (tipo y concentración) y reacciones biológicas y fisicoquímicas.

La variación de la actividad de biodegradación dada a las concentraciones de 10, 20 y 30 mg/l de carbofurán referentes a los ensayos con hongos aislados a partir de suelos agrícolas con cultivos de "cacao" y "coca" respectivamente, fueron contrastadas mediante el análisis de varianza con los datos obtenidos en cada uno de los tratamientos, a un nivel de confianza del 95% como se muestran en las tablas 7 y 8. Obteniéndose diferencias significativas en los dos ensayos. Quintero (2011)¹⁰ y Domínguez (2011)⁴, plantean que los hongos exhiben tres principales sistemas enzimáticos empleados para la degradación de contaminantes ambientales. Siendo el mecanismo ligninolítico el más ampliamente estudiado y usado en biorremediación, pues muestra que el sistema de degradación de la lignina, interviene en la oxidación de un número importante de xenobióticos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, tintes

sintéticos o naturales y algunos plaguicidas. Sin embargo, Tanabe y Matsumoto (2002)⁵⁷ mencionan que la degradación de la mayoría de plaguicidas entre ellas carbofurán no es mediante el sistema ligninolítico de degradación y que los procesos reductivos, seguidos de la oxidación intracelular; son los mecanismos involucrados en las biotransformaciones de los plaguicidas. Chaudhry *et al.* (2002)⁵⁸, propone dos rutas principales de degradación de los N-metilcarbamatos (carbofurán), la vía oxidante y la vía hidrolítica mediante las enzimas carbamato hidrolazas. Sin embargo, menciona que la degradación por la vía oxidante de los N-metilcarbamatos, produce metabolitos que son más tóxicos que el mismo compuesto parental. Por otro lado, reportan que la hidrólisis enzimática del enlace N-metilcarbamato es el mecanismo primario de inactivación de estos plaguicidas carbamatos, haciendo énfasis en la hidrólisis del enlace carbamato que podría ocurrir por rompimiento del enlace éster (el grupo carbonilo del ácido N-metilcarbámico unido al fenol), o por rompimiento del enlace amida. En ambos casos, tanto con la amidasa o con la esterasa, el producto de la hidrólisis es idéntico por la inestabilidad del enlace del ácido N-metilcarbamato, produciendo carbofurán 7-fenol (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol) (Anexo 20), metabolito menos tóxico que el carbofurán, y metilamina, la cual actúa como fuente de carbono y/o de nitrógeno. Roza y Cardenal (2013)⁵⁹, hacen referencia que las enzimas carbamato hidrolazas fueron detectadas mayormente en bacterias; sin embargo, Zhang *et al.* (2003)⁶⁰; detectaron dichas enzimas en especies de hongos como *Aspergillus sp.*, vinculando así que estos procesos de biodegradación pueden estar relacionados a los resultados de éste trabajo.

La Tabla 6 muestra 18 cepas de hongos aislados que forman los consorcios de “cacao” y “coca” de las cuales fueron diferenciadas mediante sus características culturales (Tablas 10 y 11) que facilitaron en la identificación de los géneros de hongos (Tabla 12) mediante la utilización de claves pictóricas y diferentes revisiones bibliográficas³⁴⁻⁴⁰ tal como muestra en los Anexos 26 y 27, de los cuales, se identificaron cuatro géneros de hongos como se muestran en la Tabla 12: *Penicillium sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.*

Khoi (2012)⁶¹ reporta a *Fusarium sp.*, como un hongo que degradador que fué aislado a partir de suelos contaminados con carbofurán; además, Wang *et al.* (2010)⁶², Hasan (1999)⁶³ y Medina *et al.* (2012)⁶⁴ reportan a *Penicillium sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, y *Fusarium sp.* como hongos de interés

ambiental en la degradación de diferentes contaminantes ambientales como los pesticidas. Así mismo, Salama (1998)⁶⁵ estudió el metabolismo de carbofurán en cultivos puros de *Aspergillus niger* y *Fusarium graminearum* mostrando la biotransformación de éste pesticida a menor tiempo en comparación a éste trabajo, donde los valores de la vida media terminal de carbofurán fueron 10 y 12 días en los medios de con *A. niger* y *F. graminearum*, respectivamente y las cantidades de carbofurán alcanzaron 15.56% y 19.71% de la dosis aplicada después de 21 días, cabe mencionar que todas las investigaciones relacionadas al estudio de la biodegradación del carbofurán con la utilización de hongos varían en relación a las técnicas utilizadas para demostrar la biotransformación del pesticida, donde algunas referencias hacen mención al uso individual de hongos en la degradación de ciertos pesticidas.^{5,6,7,65} Sin embargo, al comprar las evidencias anteriores en la utilización de los hongos en la biodegradación de carbofurán guarda estrecha relación a los hongos identificados en éste trabajo.

VI. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 18 cepas de hongos con capacidad biodegradadora del carbofurán a partir de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa de los Valles del Río Apurímac, Ene y Mantaro; de las cuales, 12 fueron aislados a partir de suelos con cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" y 6 a partir de suelos con cultivos de *Erythroxylum coca* "coca".
2. La actividad biodegradadora del carbofurán mediante el consorcio de hongos aislados a partir de suelos de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" muestra una remoción de hasta 79%; mientras que con el consorcio de hongos aislados a partir de suelos de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca" muestran una remoción de 59% respecto a las concentraciones iniciales. Las diferencias de la actividad biodegradadora de los ensayos entre el consorcio de hongos aislados de suelos con cultivos de "cacao y coca"; está influenciada por el número de cepas que fueron inoculadas y por la concentración de cada tratamiento, logrando remover mayor cantidad de pesticida a una concentración inicial de 10 mg/l de carbofurán respecto a los dos ensayos.
3. Se identificaron 18 cepas de hongos con capacidad biodegradadora de carbofurán aislados a partir de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa de los valles del Río Apurímac, Ene y Mantaro; de los cuales 12 cepas que conforman el consorcio de hongos aisladas a partir de suelos agrícolas de cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" están conformadas por los géneros: *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Paecilomyces sp.* y *Penicillium sp.*; mientras que 6 cepas que conforman el consorcio de hongos aislados a partir de suelos agrícolas de cultivos de *Erythroxylum coca* "coca" están conformados por: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Paecilomyces sp.*

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** Continuar con más investigaciones relacionadas a éste trabajo, tales como la determinación de la biodegradación de otros xenobióticos contaminantes con la optimización de cepas de consorcios microbianos, entre ellos los hongos, en condiciones de campo para su aplicación en la biorremediación e inducir a la proliferación de organismos capaces de degradar pesticidas y así recuperar a futuro zonas contaminadas con agroquímicos.
- 2.** Es necesario realizar éste tipo de investigación a un nivel experimental con manejo de variables, ya sea con ensayos en distintas temperaturas, distintos volúmenes de inóculo, a mayores concentraciones del pesticida, etc.
- 3.** Promover el manejo adecuado de diversos plaguicidas, respetando la ecología del suelo y cuidado ambiental.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. UNODC. Problemática ambiental y utilización de agroquímicos en la producción de coca [Internet]. 2010 oct p. 4. Recuperado a partir de: http://www.unodc.org/documents/peruandecuador//Informes/Informes-Analiticos/Informe_Analitico_Agroquimicos.pdf
2. Comisión Nacional para el Desarrollo y Vida sin Drogas DEVIDA. Problemática ambiental y la utilización de agroquímicos en producción de coca [Internet]. DEVIDA; 2010 [citado 14 de abril de 2014] p. Lima - Perú. Recuperado a partir de: http://www.unodc.org/documents/peruandecuador//Informes/Informes-Analiticos/Informe_Analitico_Agroquimicos.pdf
3. Cruz-Guzmán M. La Contaminación de Suelos y Aguas. Su Prevención con nuevas Sustancias Naturales. España: Univ. Sevilla; 2007.
4. Domínguez-Guilarte OL, Ramos-Leal M, Sánchez-Reyes A, -León AMM, Argüelles-Álvarez J, Sánchez-López MI, et al. Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca [Internet]. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 2011 [citado 4 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=181222256004>
5. Slaoui M, Ouhssine M, Berny E, Elyachioui M. Biodegradación del carbofurán por un hongo aislado de suelo tratado. Full Length Res Pap [Internet]. noviembre de 2006 [citado 14 de abril de 2013];vol. 6(4). Recuperado a partir de: http://www.academicjournals.org/article/article1380202220_Slaoui%20et%20al.pdf
6. Seo J, Jeon J, DomKim S, Kang S, Han J, Hur H. Biodegradación del carbofurán y fenol carbofurán por el hongo *Mucor ramannianus* y la identificación de los metabolitos. WaterScience Technol [Internet]. 2007 [citado 14 de abril de 2013];167(5). Recuperado a partir de: <http://www.aeml.or.kr/html/2007/Fungal.pdf>
7. Yang L, Chen S, Hu M, Hao W, Geng P, Zhang Y. Biodegradation of carbofuran by *Pichia anomala* strain HQ-C-01 and its application for bioremediation of contaminated soils. Biol Fertil Soils [Internet]. 1 de noviembre de 2011 [citado 29 de agosto de 2014];47(8):917-23. Recuperado a partir de: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00374-011-0602-0>
8. Das AC, Chakravarty A, Sukul P, Mukherjee D. Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. Chemosphere [Internet]. diciembre de 2003 [citado 29 de agosto de 2014];53(8):1033-7. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653503007136>
9. Barr D, Aust S. Mecanismos de hongos de pudrición blanca que usan para degradar contaminantes. Environ Sci Technol [Internet]. 1994 [citado 15 de abril de 2013]; Recuperado a partir de: http://www.researchgate.net/publication/225183753_Mechanisms_white_rot_fungi_use_to_degrade_pollutants
10. Quintero J. Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera. FacNalAgrMedellin [Internet]. febrero de 2011 [citado 22 de abril de 2013]; Recuperado a partir de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n1/a12v64n01.pdf>

11. Bending GD, Friloux M, Walker A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 18 de junio de 2002 [citado 30 de agosto de 2014];212(1):59-63. Recuperado a partir de:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378109702007103>
12. Chuchón E. Biodegradación de carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Chiara, Ayacucho Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013.
13. Benítez R. Plaguicidas y efectos sobre la Salud Humana: un Estado de Arte [Internet]. Benezuela; 2012 [citado 8 de febrero de 2014]. 97 p. Recuperado a partir de:
<http://www.serpajpy.org.py/wp-content/uploads/2014/03/Plaguicidas-y-efectos-sobre-la-salud-humana1.pdf>
14. CEPIS/OPS. Curso de autoinstrucción en diagnóstico, tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas [Internet]. 2008 [citado 3 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de:
http://www.bvsde.paho.org/foro_hispano/Temas.htm
15. PNUMA. Documento de guía para el acopio, la reunión y la evaluación de datos sobre fuentes, concentraciones ambientales y efectos de sustancias tóxicas persistentes [Internet]. 2000. Recuperado a partir de:
www.chem.unep.ch/pts/guidoc/sp/guidocsp.doc
16. WHO | The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard [Internet]. WHO. 2009 [citado 26 de julio de 2014]. Recuperado a partir de:
http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/
17. Martiniano J. prevención laboral: Los Plaguicidas la Salud. [Internet]. 2013 [citado 28 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de:
<http://prevencioncolonia.blogspot.com/2011/03/los-plaguicidas-y-la-salud.html>
18. Ware G, Whitacre D. Introducción a los Pesticidas: Compendio de los Nombres Comunes de los Pesticidas. MesiterPro [Internet]. 2004 [citado 6 de abril de 2013]; Recuperado a partir de:
<http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/W&WinsectSP.htm>
19. Maldonado A, Martínez AL. Impacto de las fumigaciones aéreas en las bananeras de Las Ramas-Salitre-Guayas. FEDESO [Internet]. enero de 2007 [citado 6 de mayo de 2013]; Recuperado a partir de: http://www.rap-al.org/db_files/PlaguiAL_InfoPa_Ecuador_Fumig_Aereas_Banan_07.pdf
20. Rap-al.org. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL). Rap-Along [Internet]. 2008 [citado 25 de abril de 2013]; Recuperado a partir de:
http://www.rap-al.org/articulos_files/Carbofurano_Enlace_83.pdf
21. Nj.gov. Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores de New Jersey (DESASEPM). Nj.gov [Internet]. 1998 [citado 15 de mayo de 2013]; Recuperado a partir de:
<http://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/0164sp.pdf>
22. Souza J. La problemática del uso de plaguicidas en la región hortícola bonaerense. Minist Salud Nación - Organ Mund Salud OMS [Internet]. 2007 [citado 8 de mayo de 2013];01. Recuperado a partir de:
<http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/unida/file/libro%20agroquimicos.pdf>
23. Levitus G, Acuña C, Ledesma S, Parody B, Segretín M. Biorremediación: organismos que limpian el ambiente [Internet]. 2004 [citado 28 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de:

- <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=36>
24. Alexander M. Introducción a la microbiología del suelo. México: AGT Editor, S.A.; 1980.
 25. Sasek V. El uso de la biorremediación para reducir la contaminación de los suelos: problemas y soluciones. República Checa: ScienceSeries; 2003.
 26. Reddy C, Mathew Z. Biorremediación potencial de los hongos de pudrición blanca. julio de 2001 [citado 16 de mayo de 2013];16(5). Recuperado a partir de: <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1992/kirk92b.pdf>
 27. Maloney S. Hongos en la degradación de plaguicidas. En Gadd G Hongos [Internet]. mayo de 2001 [citado 20 de abril de 2013];145(24). Recuperado a partir de: <http://catdir.loc.gov/catdir/samples/cam031/2001025609.pdf>
 28. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los microorganismos. 10ª Edición. Madrid-España: Prentice Hall; 2003.
 29. Infor Región-Agencia de Prensa Ambiental. venta de agroquímicos en zonas cocaleras del VRAEM [Internet]. Inforegion. 2010 [citado 20 de julio de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.inforegion.pe/portada/62439/fernan-valer-pide-limitar-venta-de-agroquimicos-en-zonas-cocaleras-del-vrae/>
 30. SENASA VRAE. Agroquímicos en cien comunidades del VREA [Internet]. Inforegion. 2009 [citado 20 de julio de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.inforegion.pe/portada/44532/alistan-campana-de-recojo-de-envases-de-agroquimicos-en-cien-comunidades-del-vrae/>
 31. Nasrawi HA. Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico. J Bioremediation Biodegrad [Internet]. 2012 [citado 1 de septiembre de 2014];03(04). Recuperado a partir de: <http://omicsonline.org/2155-6199/2155-6199-3-147.php?aid=5829>
 32. Información técnica de los medios de cultivo para hongos y levaduras [Internet]. Cosmos Online. [citado 1 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.cosmos.com.mx/wiki/gdc3/medios-de-cultivo-para-hongos-y-levaduras>
 33. Nagaraja P, Bhaskara BL. Sensitive spectrophotometric assessment of carbofuran using dapsona as a new chromogenic reagent in formulations and environmental samples. Eclética Quím [Internet]. enero de 2006 [citado 8 de agosto de 2014];31(4):43-8. Recuperado a partir de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-46702006000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 34. Barnett H, Hunter B. Géneros Ilustrados de Hongos Imperfectos. 4º Ed. Minnesota; (USA): The American Society. St Paul; 1998.
 35. Fun With Microbiology FWM [Internet]. 2012 [citado 15 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012_06_01_archive.html
 36. Emil M, Wolfgang L. Micología: Manual para naturalistas y médicos. Barcelona, España: Omega S.A.-Casanova; 1976.
 37. GEFOR. Imágenes Paecilomyces lilacinus [Internet]. [citado 16 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.gefor.4t.com/hongos/paecilomyceslilacinus.html>
 38. GEFOR. Fusarium spp. - INSPQ - Institut national de santé publique du Québec [Internet]. [citado 16 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.inspq.qc.ca/english/mould-compendium/fusarium-spp>
 39. Verónica T. Banco de imágenes Universidad de Antioquia-Escuela de Microbiología [Internet]. [citado 16 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de:

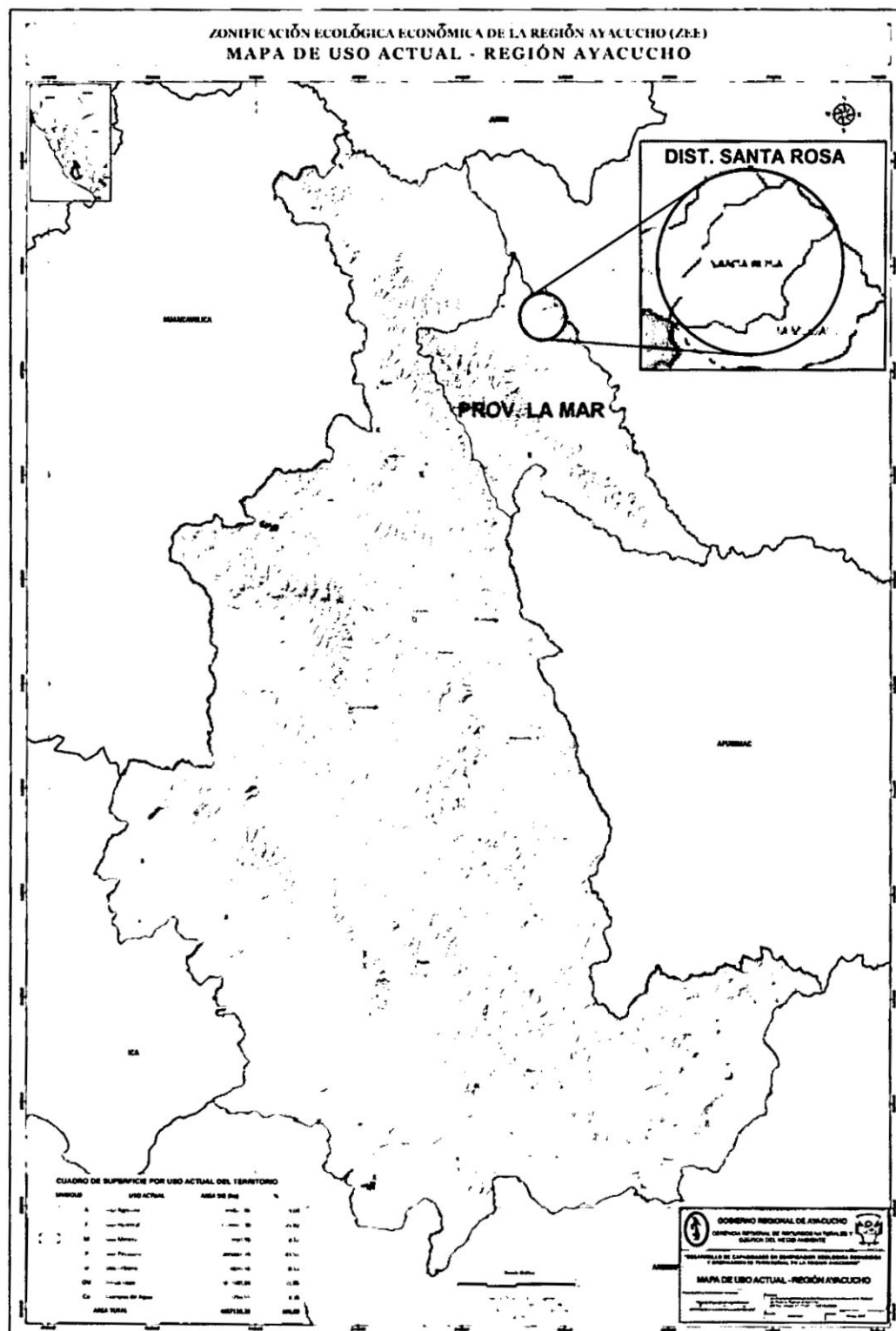
- <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100813>
40. Doctor Fungus. Paecilomyces Species [Internet]. [citado 16 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de:
<http://www.doctorfungus.org/Thefungi/paecilomyces.php>
 41. Grady CPL. Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. Biotechnol Bioeng [Internet]. 1 de mayo de 1985 [citado 20 de julio de 2014];27(5):660-74. Recuperado a partir de:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260270516/abstract>
 42. Ortiz-Hernández ML, Sánchez-Salinas E. Biodegradación del plaguicida organofosforado tetraclorvinfos por bacterias aisladas de suelos agrícolas en México. Rev Int Contam Ambient [Internet]. febrero de 2010 [citado 20 de julio de 2014];26(1):27-38. Recuperado a partir de:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0188-49992010000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=en
 43. Carrillo E, Ruiz A, Yeomans H. Aislamiento, Identificación y Evaluación de un cultivo mixto de microorganismos con capacidad para degradar DDT. Univ Sonora México [Internet]. 2004 [citado 2 de agosto de 2014];20 (2) 69-75. Recuperado a partir de:
http://ccaunam.atmosfcu.unam.mx/editorial/rica/acervo/vol_20_2/3.pdf
 44. Correa L, Salgado H, Sáenz M, Castro L, Guayazan S, Galdrón MX, et al. Características Agroculturales de los Cultivos de coca. [Internet]. Unodc; 2010 [citado 25 de julio de 2014]. Recuperado a partir de:
<http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/oferta/estudios/OF04012010-caracteristicas-agroculturales-cultivos-coca-colombia-.pdf>
 45. Mosquera B. R, Peñuela M. GA. Biodegradación del malatión utilizando microorganismos nativos de suelos agrícolas. Rev Colomb Cienc Pecu Colomb J Anim Sci Vet Med [Internet]. 13 de julio de 2009 [citado 26 de julio de 2014];22(2):189-98. Recuperado a partir de:
<http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/390>
 46. Levanon D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. Soil Biol Biochem [Internet]. agosto de 1993 [citado 26 de julio de 2014];25(8):1097-105. Recuperado a partir de:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071793901588>
 47. Mendoza JC, Perea YS, Salvador JA, Morales JA, Pérez G. Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. Av En Cienc E Ing [Internet]. 2011 [citado 27 de julio de 2014];2(3):45-55. Recuperado a partir de:
<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3751637>
 48. Castrejón M, Sánchez E, Ortiz L. Crecimiento de bacterias aisladas de suelos agrícolas sobre plaguicidas organofosforados como sustrato. Fac Cienc Biológicas Lab Investig Ambient Cent Investig En Biotecnol Univ Autónoma Estado Morelos Av Univ N° 1001 Col Chim Cuernavaca Morelos CP 62209 Tel 777 329-7057sanchezbuzonuaemmx Luicadoyahoocommx [Internet]. 2009; Recuperado a partir de:
http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Extenso/CA/EC/CAC-11.pdf
 49. Tecnología Química y Comercio (TQC). Ficha técnica de carbofor-for 4Fw [Internet]. 2010 [citado 9 de abril de 2014]. Recuperado a partir de:
http://www.tqc.com.pe/wp-content/uploads/2011/11/carbo_for_b_ficha.pdf

50. Johnson AW. Degradation of Fenamiphos in Agricultural Production Soil. *J Nematol* [Internet]. marzo de 1998 [citado 4 de septiembre de 2014];30(1):40-4. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620284/>
51. Jones RL, Norris FA. Factors Affecting Degradation of Aldicarb and Ethoprop. *J Nematol* [Internet]. marzo de 1998 [citado 4 de septiembre de 2014];30(1):45-55. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620275/>
52. Stoorvogel J, Jaramillo R, Merino R, Kosten S. Plaguicidas en el Medio Ambiente [Internet]. Ecuador; 2003 [citado 22 de agosto de 2014] p. 62-5. Recuperado a partir de: <http://edepot.wur.nl/38625>
53. Ajona J, Vidal A. The use of CPC collectors for detoxification of contaminated water: Design, construction and preliminary results. *Sol Energy* [Internet]. enero de 2000 [citado 4 de septiembre de 2014];68(1):109-20. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038092X9900047X>
54. Caplan JA. The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Trends Biotechnol* [Internet]. agosto de 1993 [citado 8 de septiembre de 2014];11(8):320-3. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016777999390153Z>
55. Furukawa K. 'Super bugs' for bioremediation. *Trends Biotechnol* [Internet]. 1 de mayo de 2003 [citado 8 de septiembre de 2014];21(5):187-90. Recuperado a partir de: <http://www.cell.com/article/S0167779903000544/abstract>
56. Liu S, Suflita JM. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends Biotechnol*. agosto de 1993;11(8):344-52.
57. Tanabe K, Matsumoto T. Prediction of Carcinogenicity of Chlorine-containing Organic Compounds by Neural Network. *J Comput Chem Jpn* [Internet]. 2002 [citado 13 de agosto de 2014];1(1):23-8. Recuperado a partir de: http://www.researchgate.net/publication/251006642_Prediction_of_Carcinogenicity_of_Chlorine-containing_Organic_Compounds_by_Neural_Network
58. Chaudhry GR, Mateen A, Kaskar B, Sardesai M, Bloda M, Bhatti AR, et al. Induction of carbofuran oxidation to 4-hydroxycarbofuran by *Pseudomonas* sp. 50432. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 10 de septiembre de 2002 [citado 14 de septiembre de 2014];214(2):171-6. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378109702008510>
59. Rozo JC, Cardenal LYR. Microorganismos, Enzimas, Plásmidos Y Genes Involucrados En La Degradación De Plaguicidas N-Metilcarbamatos [Internet]. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013 [citado 14 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=37028958006>
60. Zhang Q, Liu Y, Liu Y-H. Purification and characterization of a novel carbaryl hydrolase from *Aspergillus niger* PY168. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 7 de noviembre de 2003 [citado 14 de septiembre de 2014];228(1):39-44. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378109703007183>
61. Khoi NN. Five fungal strains with genus of *Fusarium* sp. were isolated from... [Internet]. *researchGate*. 2012 [citado 15 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: http://www.researchgate.net/post/Five_fungal_strains_with_genus_of_Fusarium_sp_were_isolated_from_Carbofuran_CF_contaminated_soil_Why_do_they_grow_well_but_not_degrade_CF_in_MSM

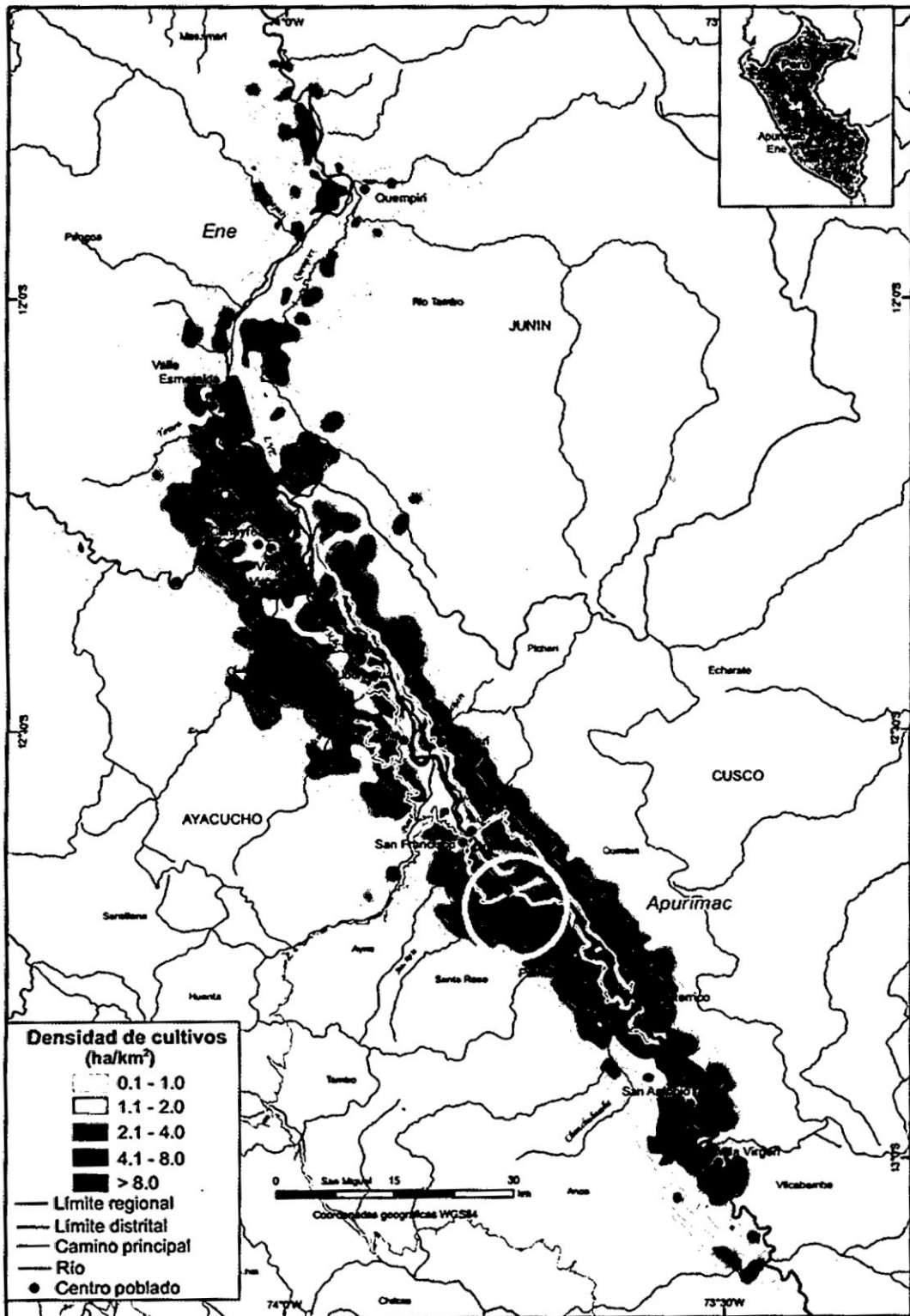
62. Wang L, Li Y, Yu P, Xie Z, Luo Y, Lin Y. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. *J Hazard Mater* [Internet]. 15 de noviembre de 2010 [citado 15 de septiembre de 2014];183(1-3):366-71. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389410009180>
63. Hasan HA. Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil. *Folia Microbiol (Praha)*. 1999;44(1):77-84.
64. Medina S, Torres M, Durán Y, Ramírez R, Herrera J, Ramírez P. Degradación de tiocianato por hongos aislados de ambientes mineros y evaluación de su capacidad degradativa. *Rev Peru Biol* [Internet]. abril de 2012 [citado 15 de septiembre de 2014];19(1):81-8. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1727-99332012000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
65. Salama AK. Metabolism of carbofuran by *Aspergillus niger* and *Fusarium graminearum*. *J Environ Sci Health B* [Internet]. mayo de 1998;33(3):253-66. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9604338>

ANEXOS

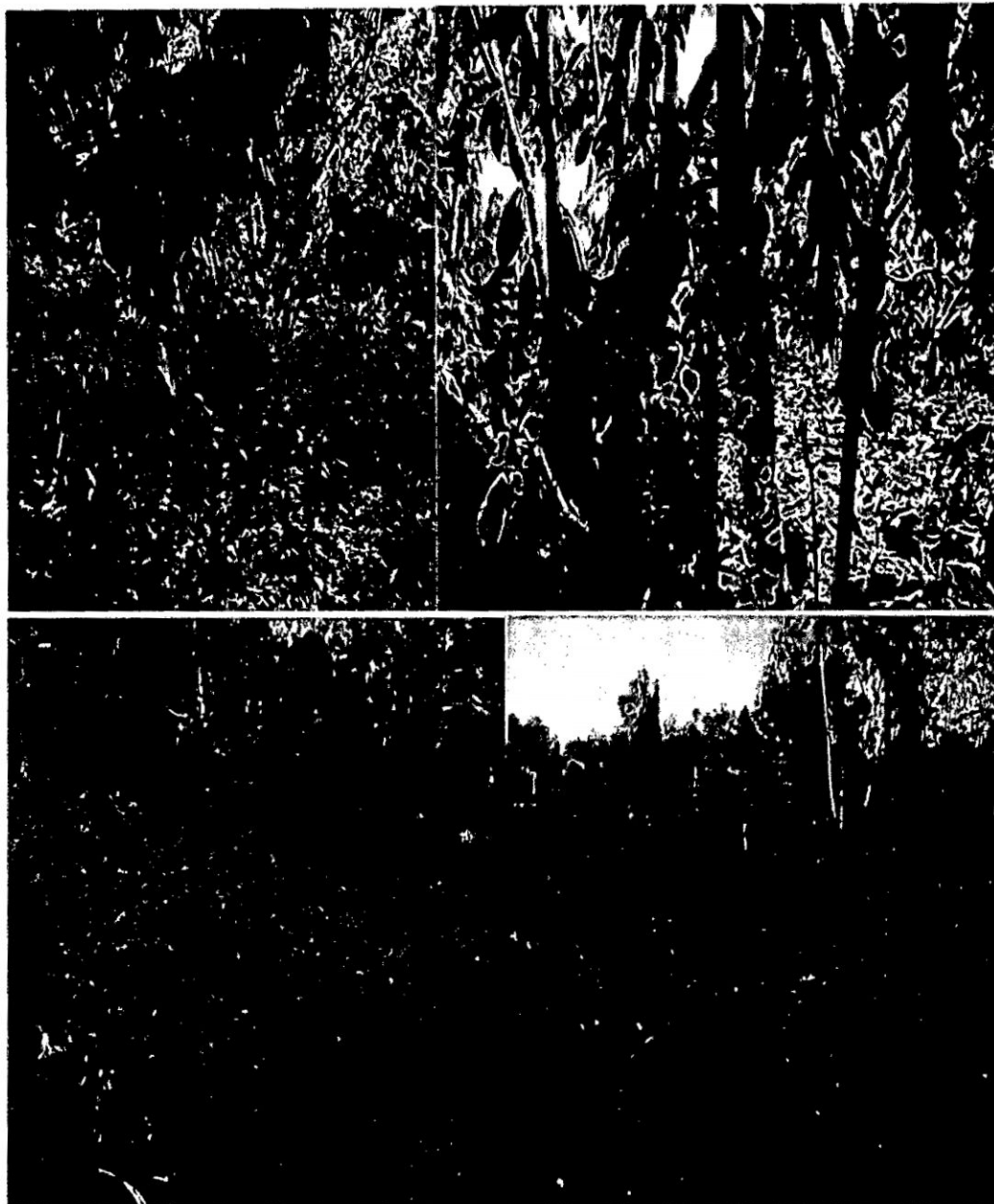
ANEXO 1. Mapa del uso actual del territorio regional de Ayacucho y zonas de muestreo (G.R.A., 2013), Ayacucho 2014.



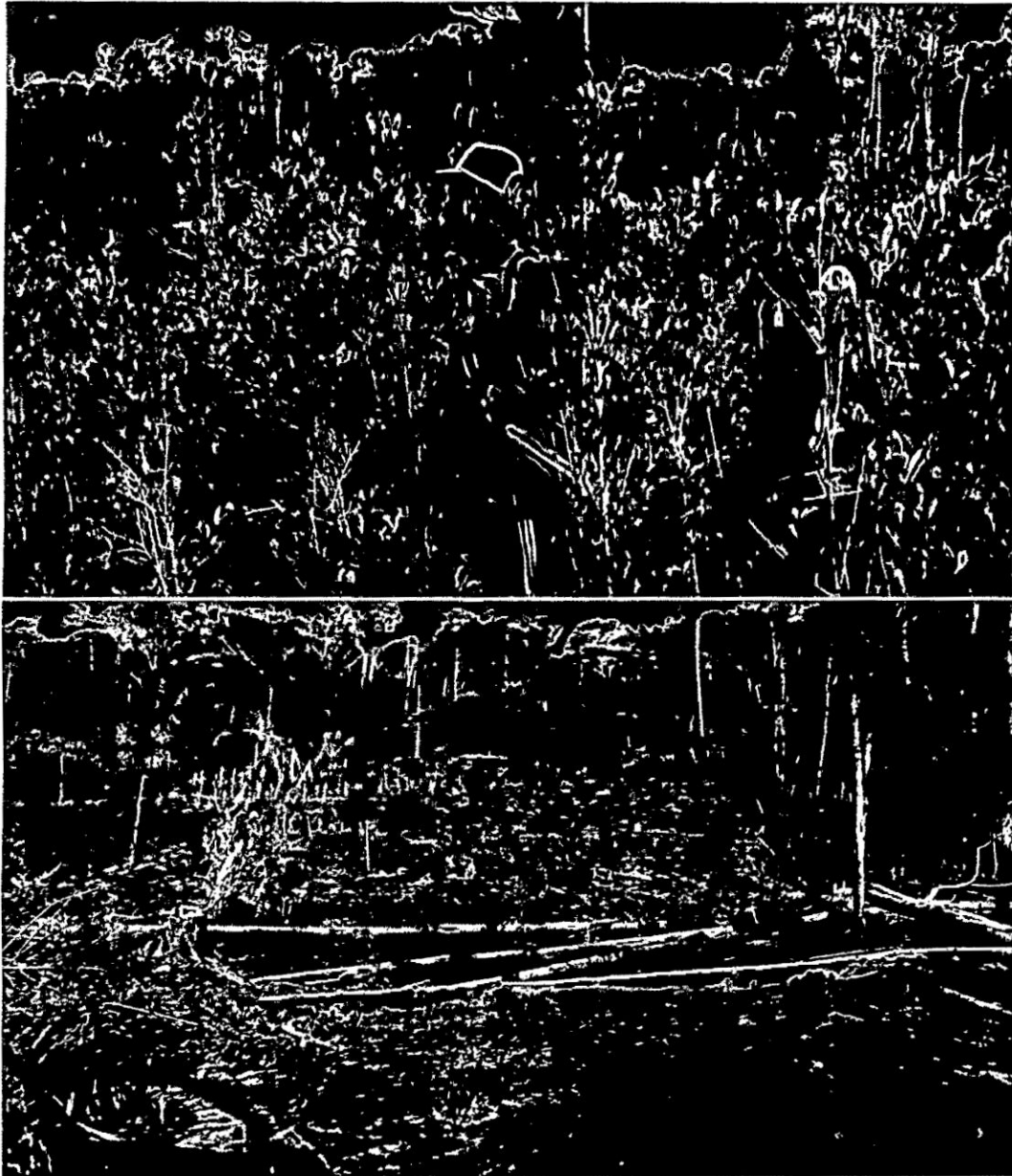
ANEXO 2. Densidad de cultivo de coca en el VRAEM, 2013. (Sistema nacional de monitoreo apoyado por UNODC – Gobierno de Perú), Ayacucho 2014.



ANEXO 3. Suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa-VRAEM con cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" y *Erythroxylum coca* "coca", Ayacucho 2014.



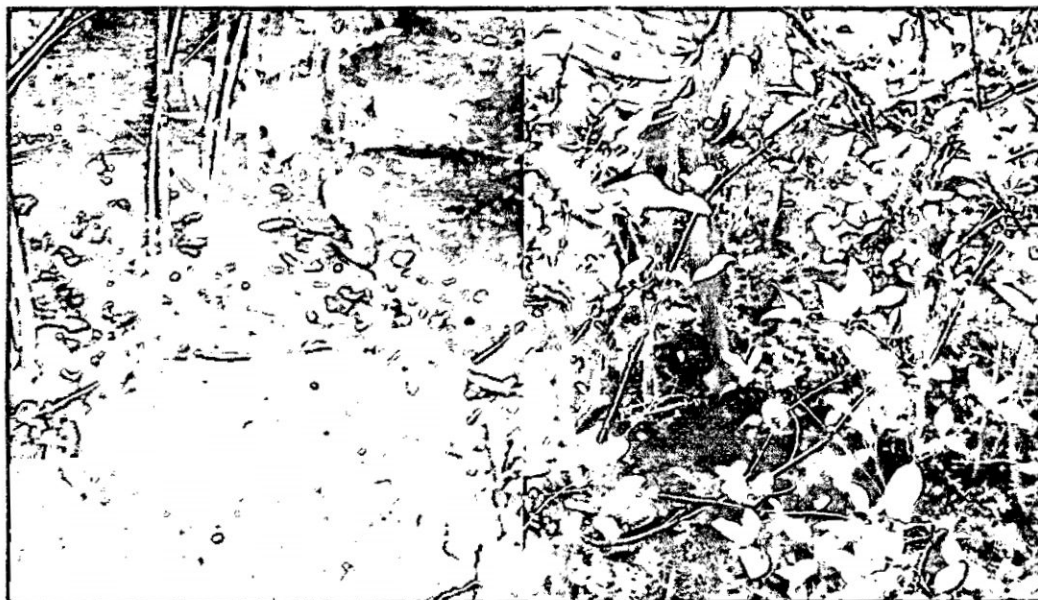
ANEXO 4. Aplicación de plaguicidas en cultivos de *Erythroxylum coca* "coca" y deforestación de bosques para su cultivo. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



ANEXO 5. Eliminación inadecuada de frascos con pesticidas utilizados para los cultivos de *Erythroxylum coca* "coca" adquiridos de establecimientos que comercializan plaguicidas agrícolas. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



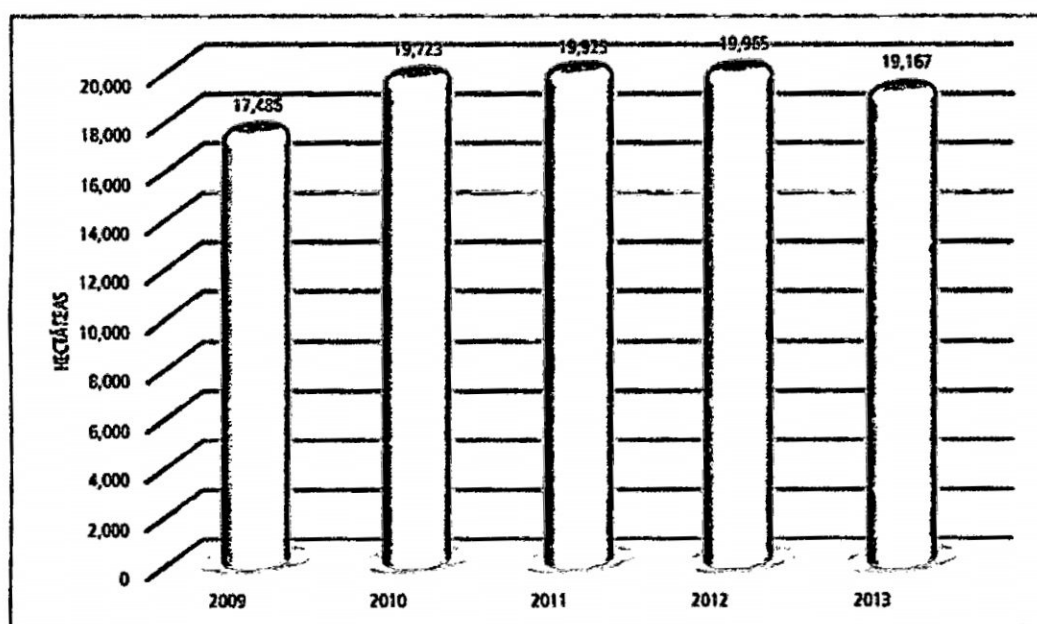
ANEXO 6. Modo de muestreo de suelos agrícolas de distrito de Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



ANEXO 7. Representación comercial de carbofurán (Diafurán), Ayacucho 2014.



ANEXO 8. Distribución del cultivo de *Erythroxylum coca* "coca" en el VRAEM, 2009 – 2013 (ha). (Sistema Nacional de Monitoreo apoyado por UNODC), Ayacucho 2014.



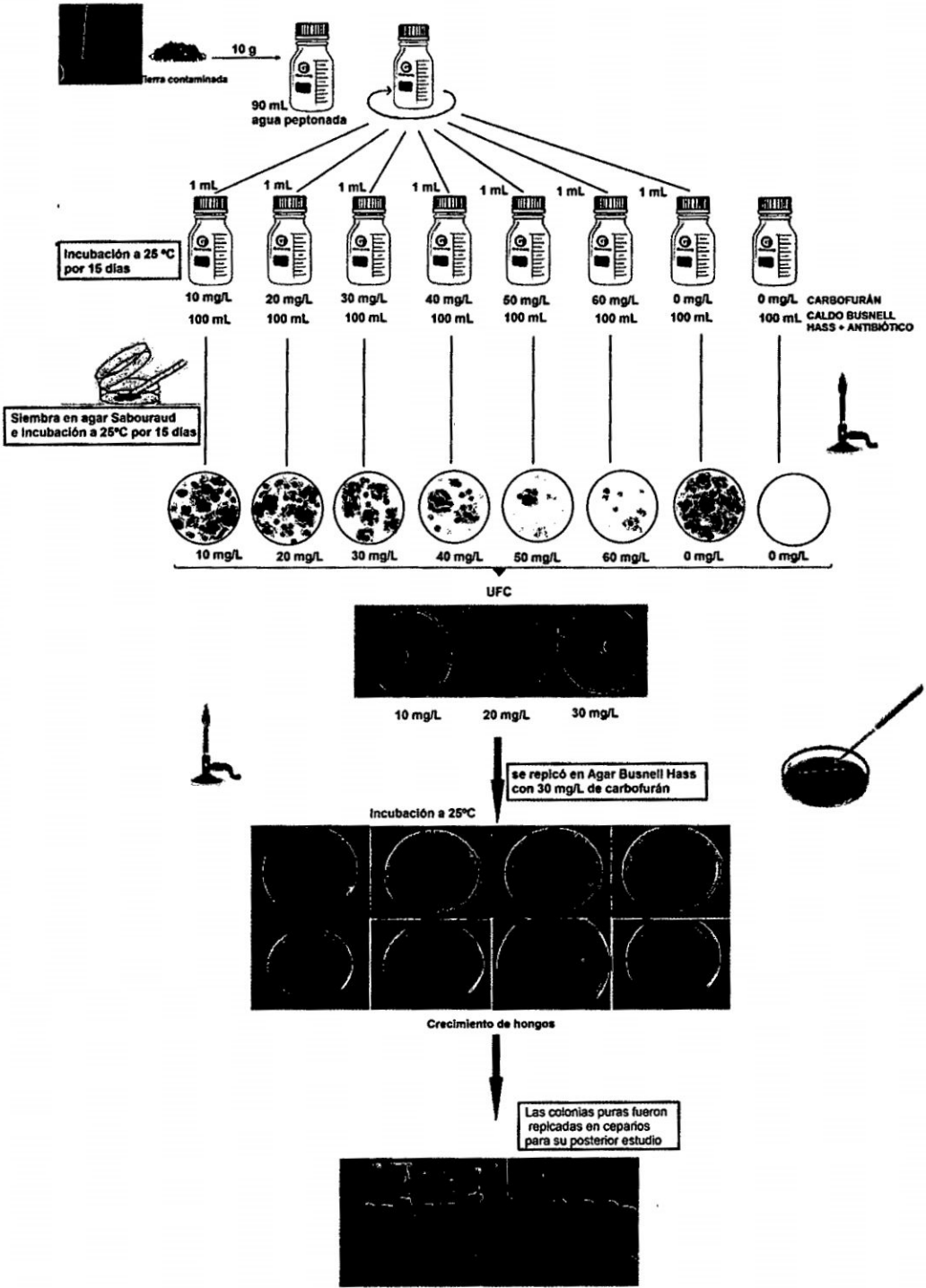
Fuente: Sistema Nacional de Monitoreo apoyado por UNODC

ANEXO 9. Composición del medio de cultivo Busnell Hass (García y Garzón, 2005), Ayacucho 2014.

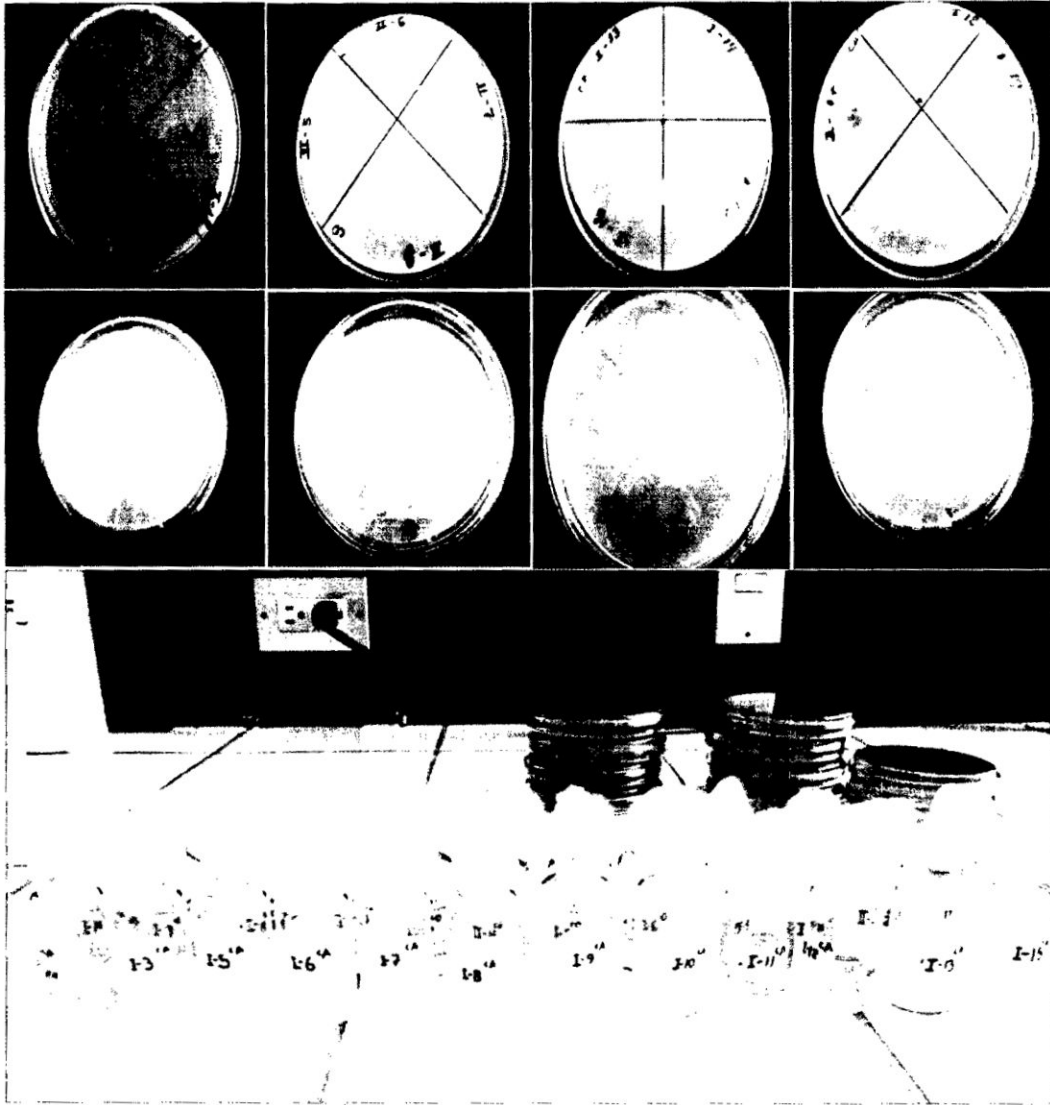
INGREDIENTES	CANTIDAD
KH₂PO₄ : Fosfato mono potásico	1 g/l
K₂HPO₄ : Fosfato di potásico	1 g/l
MgSO₄.7H₂O : Sulfato de magnesio	0,2 g/l
CaCl₂ : Cloruro de calcio	0,02 g/l
NH₄NO₃ : Nitrato de amonio	1 g/l
FeCl₂.6H₂O : Cloruro de hierro	0,05 g/l

Observación: Llevar a 1 l con agua destilada, ajusta el pH a 7,00 homogenizar bien. Esterilizar en autoclave 121° C, 15 Lb/pulg² por 15 minutos.

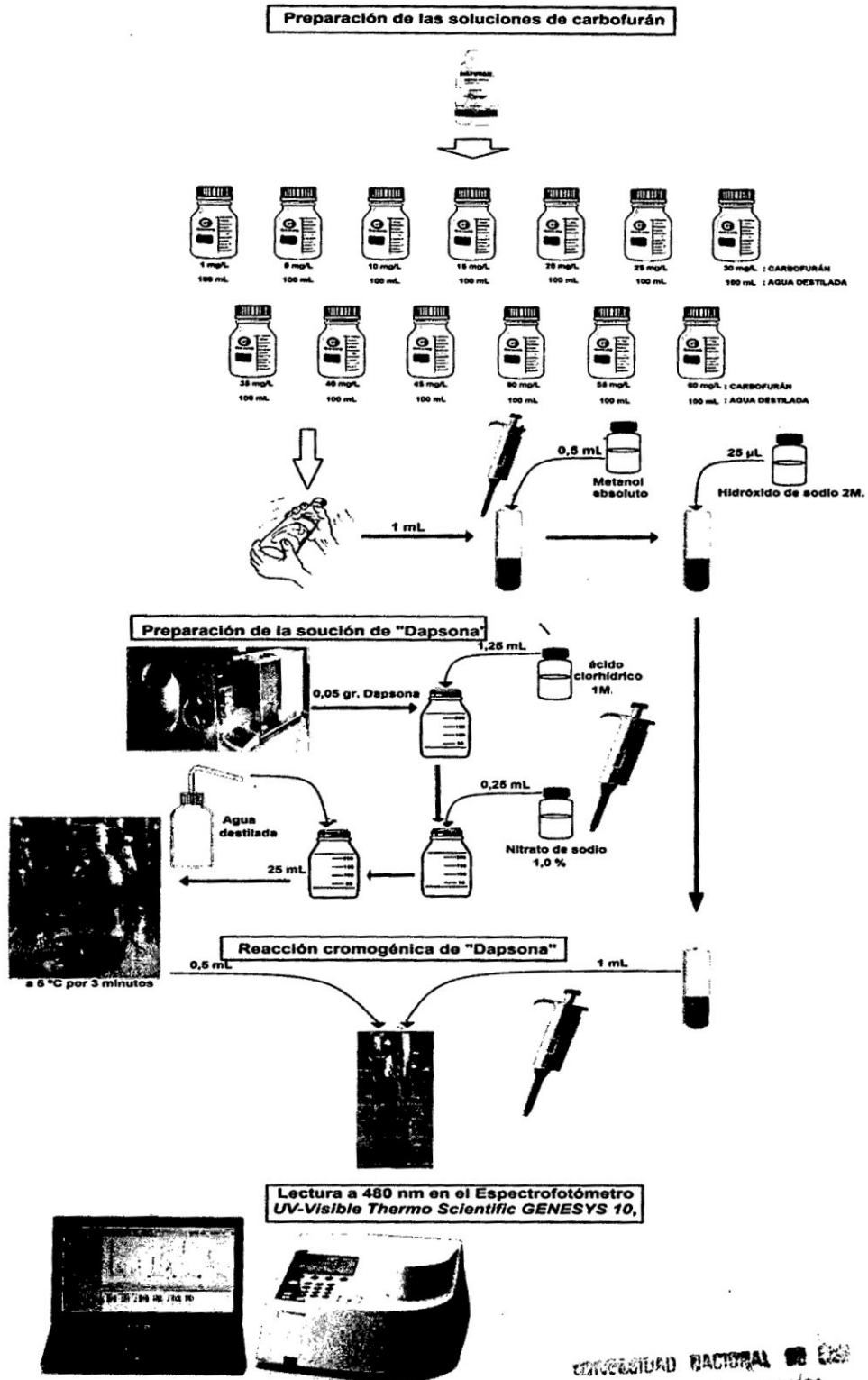
ANEXO 10. Flujograma del aislamiento de hongos degradadores de carbofurán de suelos agrícolas. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



ANEXO 11. Colonias sobre agar Busanell Hass enriquecidos con carbofurán a 30 mg/l y la purificación y aislamiento en ceparios con agar Sabouraud, Ayacucho 2014.

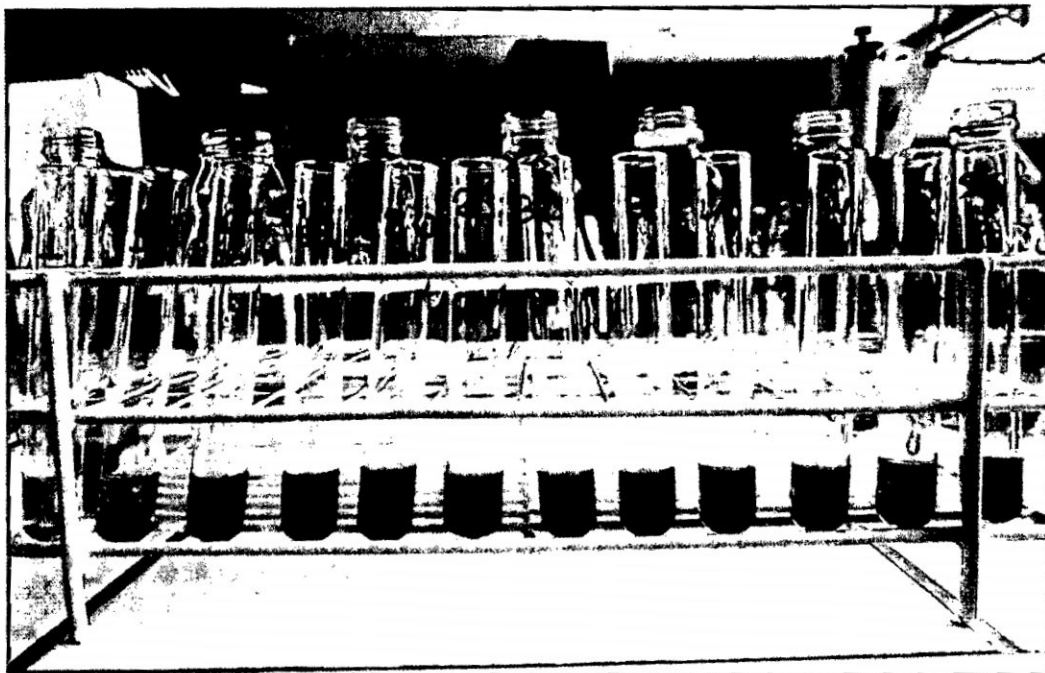


ANEXO 12. Flujoograma de estandarización de la curva patrón por la técnica cromogénica de DAPSONA, Ayacucho 2014.

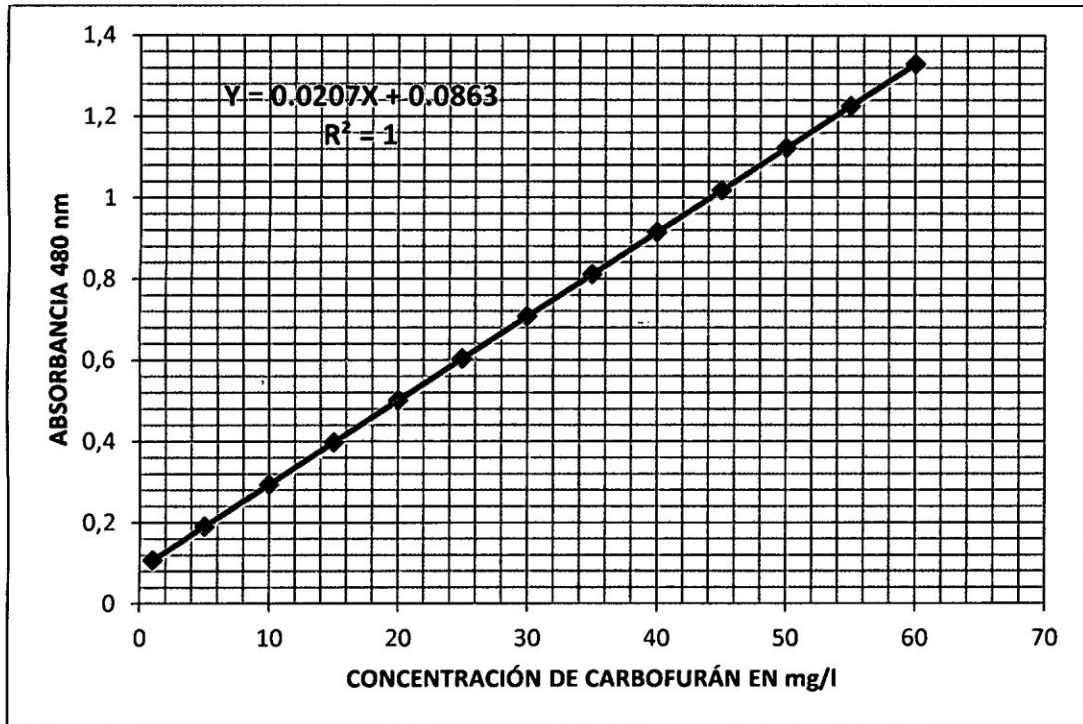


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
BIBLIOTECA

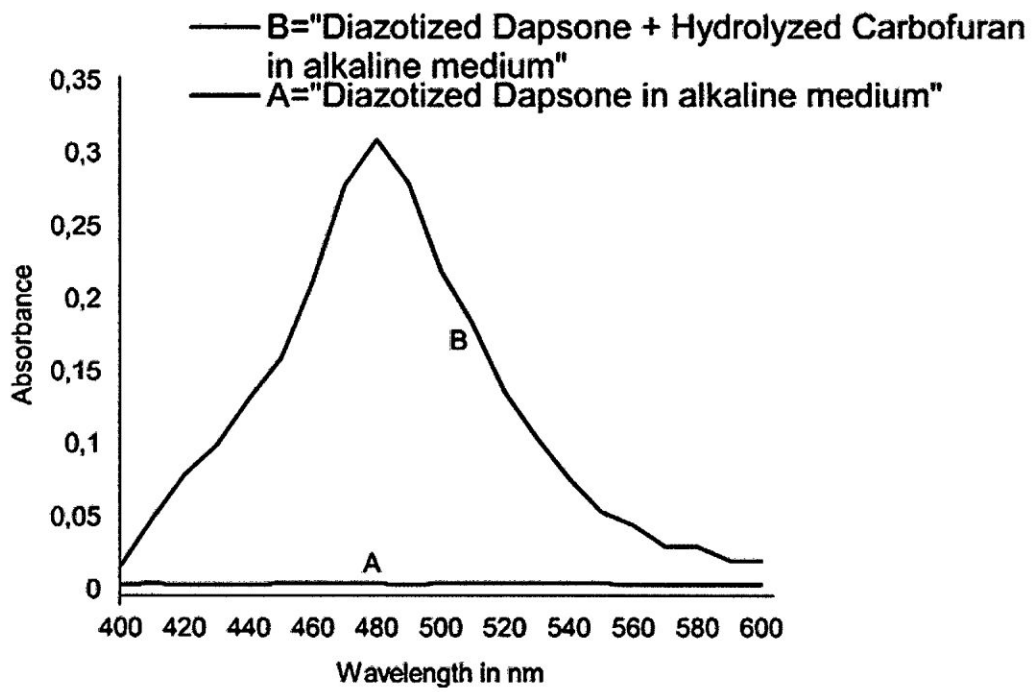
ANEXO 13. Reacción cromogénica de DAPSONA a diferentes concentraciones de carbofurán para la determinación de la curva patrón, Ayacucho 2014.



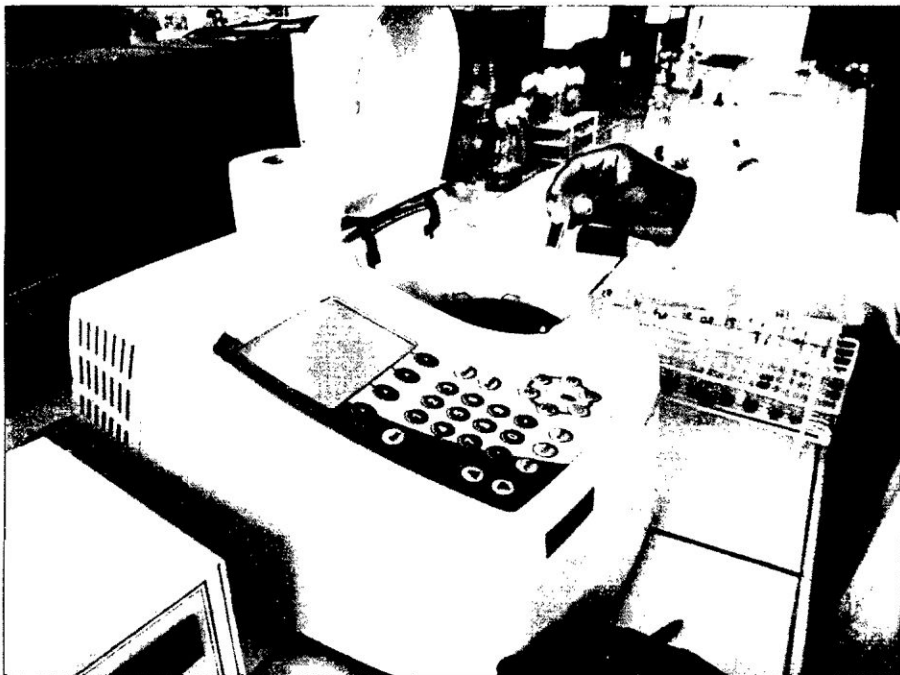
ANEXO 14. Curva y ecuación patrón estandarizado para la determinación de las concentraciones de carbofurán, Ayacucho 2014.



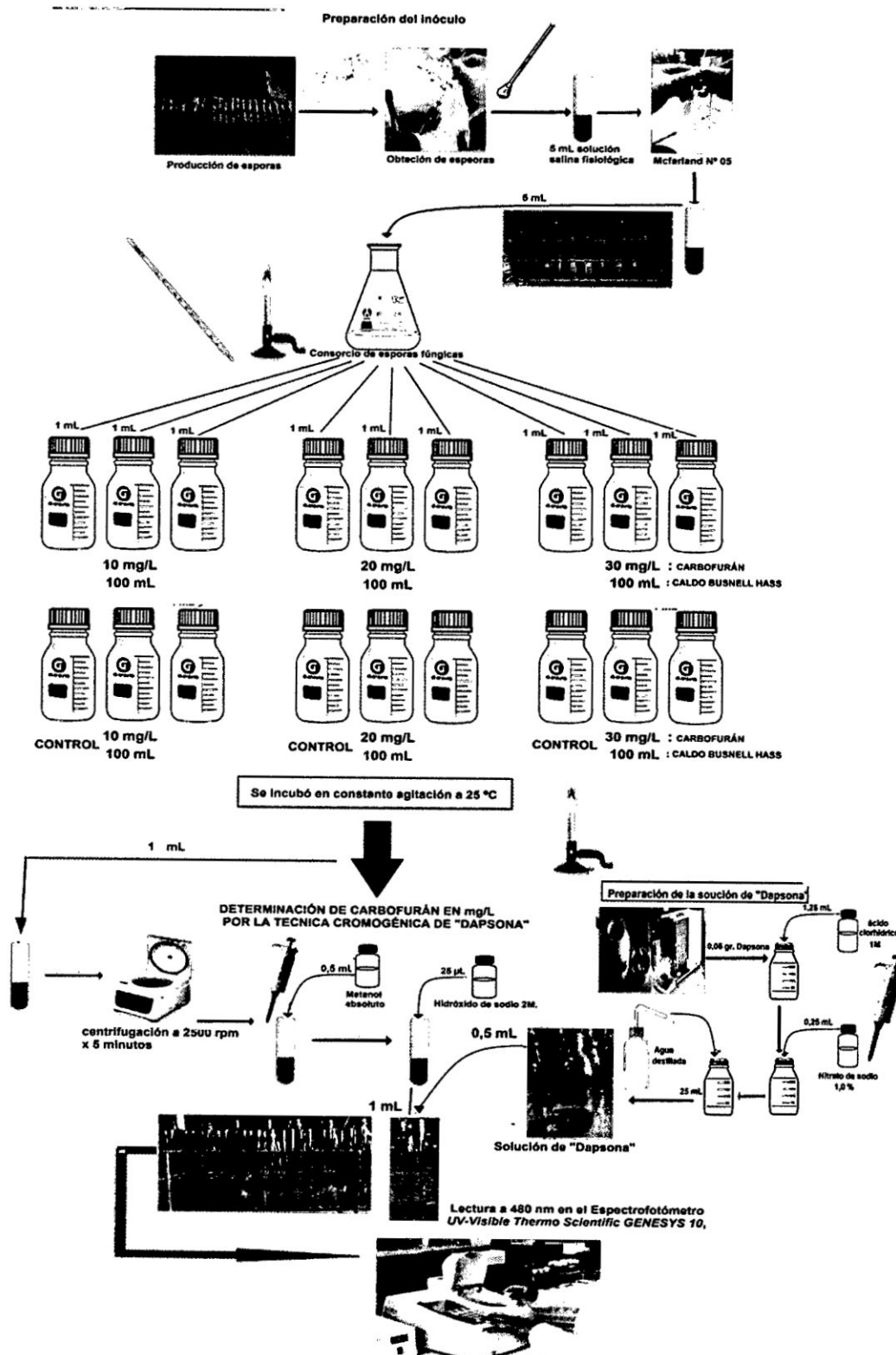
ANEXO 15. Espectro de absorción entre el reactivo blanco con la reacción del producto hidrolizado de Carbofurán y Dapsona Diazotado en medio alcalino, (Nagaraja y Bhaskara, 2006), Ayacucho 2014.



ANEXO 16. Proceso de medición de la absorbancia en le espectrofotómetro *UV-visible Thermo Scientific Serie GENESYS 10* a 480 nm., Ayacucho 2014.



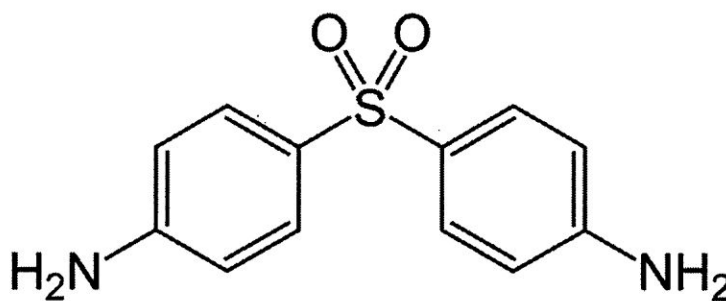
ANEXO 17. Flujograma de ensayo de biodegradación de carbofurán por el consorcio de hongos aislados de suelos agrícolas. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



ANEXO 19. Características fisicoquímicas de Dapsona, Ayacucho 2014.

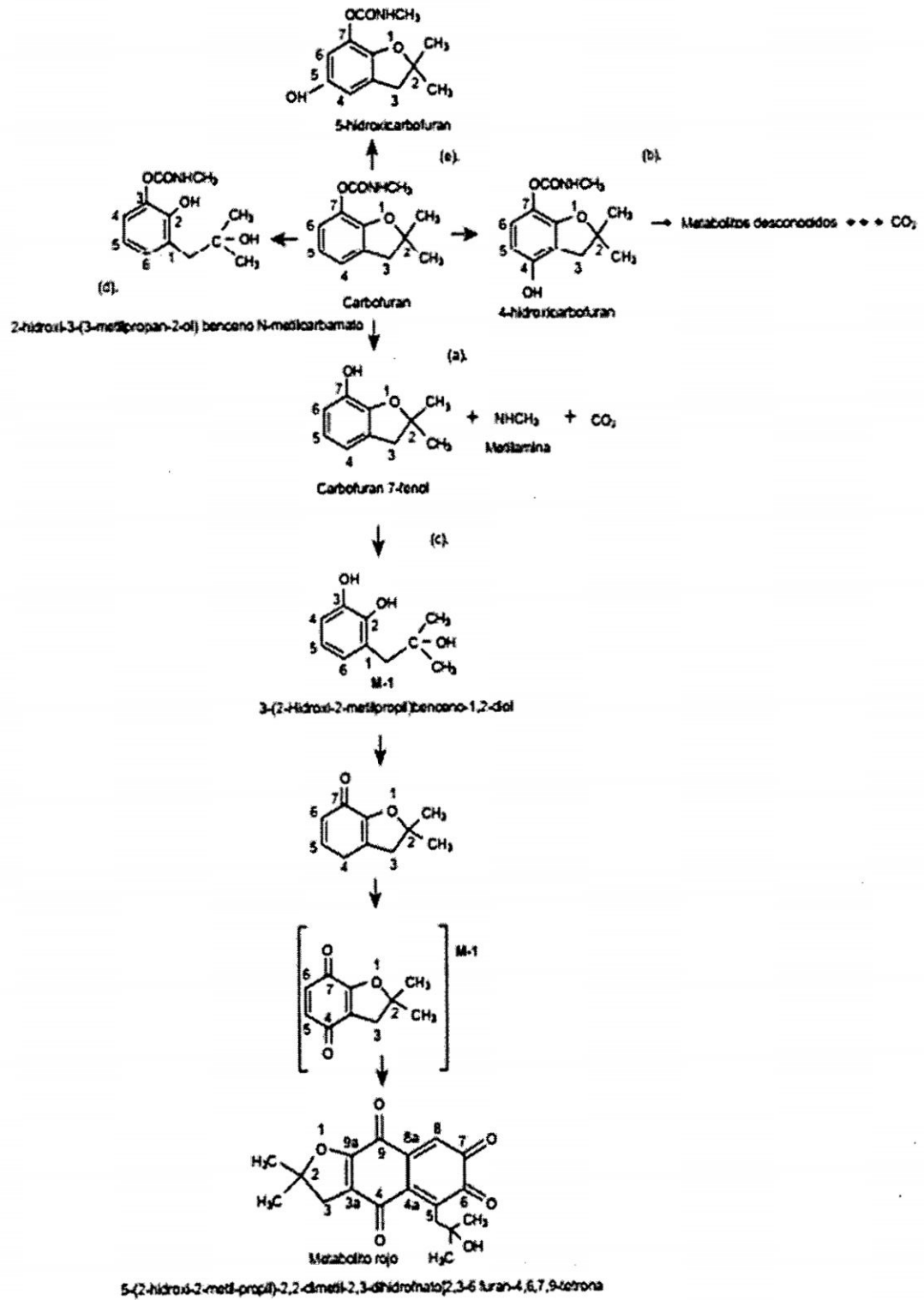
- Nombre químico: 4,4-diaminodifenilsulfona.
- Fórmula molecular: $C_{12}H_{12}N_2O_2S$.
- Peso molecular: 248,30 g/mol.
- Características físicas: polvo cristalino, blanco o amarillo pálido sin olor.
- Punto de fusión: 175-176 °C (existe una forma con un punto de fusión de 180.5 °C).
- Solubilidad: Casi insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y muy soluble en acetona
- Características especiales: producto fotosensible

Es un antibiótico bacteriostático, pero no bactericida, usado para el tratamiento de la lepra, malaria, desórdenes dermatológicos de origen autoinmune, acné, artritis reumatoide y además tiene algunas propiedades quimioterapéuticas.



Estructura química de DAPSONA

ANEXO 20. Rutas metabólicas empleadas por los microorganismos para la degradación de carbofurán (Rozo JC, Cardenal LYR, 2013), Ayacucho 2014.



ANEXO 21. Valores de absorbancia en relación a diferentes concentraciones de carbofurán obtenidas durante el ensayo de biodegradación por hongos aislados a partir de suelos con cultivos de *Theobroma cacao* "cacao".

N°	ENSAYO	REPETICIÓN	0° día	5 día	10 día	15 día	20 día	25 día	30 día	35 día	40 día	45 día
1		10 mg/l	0,313	0,352	0,320	0,256	0,230	0,186	0,199	0,180	0,155	0,146
2		10 mg/l	0,316	0,328	0,304	0,238	0,216	0,156	0,140	0,151	0,146	0,137
3	I	10 mg/l	0,308	0,349	0,281	0,229	0,205	0,162	0,151	0,143	0,123	0,119
4		Suma	0,937	1,029	0,905	0,723	0,651	0,504	0,490	0,474	0,424	0,402
5		Promedio	0,312	0,343	0,302	0,241	0,217	0,168	0,163	0,158	0,141	0,134
6		10 mg/L	0,312	0,314	0,317	0,308	0,310	0,310	0,305	0,288	0,280	0,269
7		10 mg/L	0,305	0,305	0,307	0,312	0,308	0,291	0,276	0,260	0,250	0,242
8	BLANCO	10 mg/L	0,302	0,312	0,304	0,287	0,302	0,290	0,293	0,281	0,267	0,266
9		Suma	0,919	0,931	0,928	0,907	0,920	0,891	0,874	0,829	0,797	0,777
10		Promedio	0,306	0,310	0,309	0,302	0,307	0,297	0,291	0,276	0,266	0,259
11		20 mg/l	0,526	0,535	0,519	0,458	0,428	0,419	0,426	0,436	0,333	0,330
12		20 mg/l	0,473	0,570	0,530	0,470	0,373	0,352	0,359	0,344	0,336	0,341
13	II	20 mg/l	0,525	0,535	0,522	0,521	0,515	0,481	0,474	0,471	0,463	0,447
14		Suma	1,524	1,640	1,571	1,449	1,316	1,252	1,259	1,251	1,132	1,118
15		Promedio	0,508	0,547	0,524	0,483	0,439	0,417	0,420	0,417	0,377	0,373
16		20 mg/l	0,523	0,538	0,544	0,527	0,531	0,524	0,518	0,520	0,478	0,489
17		20 mg/l	0,536	0,451	0,460	0,420	0,429	0,430	0,431	0,437	0,470	0,463
18	BLANCO	20 mg/l	0,555	0,576	0,586	0,588	0,591	0,580	0,561	0,580	0,566	0,536
19		Suma	1,614	1,565	1,590	1,535	1,551	1,534	1,510	1,537	1,514	1,488
20		Promedio	0,538	0,522	0,530	0,512	0,517	0,511	0,503	0,512	0,505	0,496
21		30 mg/l	0,711	0,721	0,723	0,715	0,701	0,732	0,679	0,676	0,684	0,665
22		30 mg/l	0,753	0,734	0,751	0,686	0,677	0,666	0,670	0,664	0,622	0,599
23	III	30 mg/l	0,693	0,714	0,691	0,688	0,673	0,658	0,602	0,593	0,562	0,520
24		Suma	2,157	2,169	2,165	2,089	2,051	2,056	1,951	1,933	1,868	1,784
25		Promedio	0,719	0,723	0,722	0,696	0,684	0,685	0,650	0,644	0,623	0,595
26		30 mg/l	0,704	0,718	0,710	0,714	0,678	0,680	0,672	0,665	0,657	0,648
27		30 mg/l	0,716	0,711	0,720	0,722	0,719	0,717	0,699	0,697	0,688	0,677
28	BLANCO	30 mg/l	0,704	0,711	0,680	0,688	0,694	0,699	0,680	0,670	0,667	0,679
29		Suma	2,124	2,140	2,110	2,124	2,091	2,096	2,051	2,032	2,012	2,004
30		Promedio	0,708	0,713	0,703	0,708	0,697	0,699	0,684	0,677	0,671	0,668

ANEXO 22. Valores de absorbancia en relación a diferentes concentraciones de carbofurán obtenidas durante el ensayo de biodegradación por hongos aislados a partir de suelos con cultivos de *Erythroxylum coca* "coca".

N°	ENSAYO	REPETICIÓN	0° día	5 día	10 día	15 día	20 día	25 día	30 día	35 día	40 día	45 día
1		10 mg/l	0,280	0,300	0,288	0,242	0,279	0,236	0,240	0,218	0,188	0,181
2		10 mg/l	0,284	0,352	0,287	0,220	0,214	0,207	0,213	0,170	0,180	0,175
3	I	10 mg/l	0,278	0,327	0,277	0,233	0,226	0,214	0,209	0,187	0,190	0,183
4		Suma	0,842	0,979	0,852	0,695	0,719	0,657	0,662	0,575	0,558	0,539
5		Promedio	0,281	0,326	0,284	0,232	0,240	0,219	0,221	0,192	0,186	0,180
6		10 mg/l	0,288	0,310	0,308	0,302	0,277	0,269	0,261	0,264	0,277	0,272
7		10 mg/l	0,302	0,312	0,302	0,276	0,257	0,287	0,270	0,268	0,260	0,258
8	BLANCO	10 mg/l	0,275	0,302	0,281	0,302	0,320	0,314	0,306	0,290	0,279	0,270
9		Suma	0,865	0,924	0,891	0,880	0,854	0,870	0,837	0,822	0,816	0,800
10		Promedio	0,288	0,308	0,297	0,293	0,285	0,290	0,279	0,274	0,272	0,267
11		20 mg/l	0,503	0,511	0,505	0,513	0,390	0,395	0,393	0,460	0,455	0,433
12		20 mg/l	0,497	0,507	0,507	0,424	0,550	0,558	0,498	0,456	0,438	0,425
13	II	20 mg/l	0,575	0,576	0,516	0,497	0,480	0,478	0,413	0,398	0,385	0,378
14		Suma	1,575	1,594	1,528	1,434	1,420	1,431	1,304	1,314	1,278	1,236
15		Promedio	0,525	0,531	0,509	0,478	0,473	0,477	0,435	0,438	0,426	0,412
16		20 mg/l	0,501	0,497	0,504	0,510	0,513	0,490	0,484	0,488	0,492	0,486
17		20 mg/l	0,487	0,509	0,490	0,479	0,493	0,480	0,470	0,464	0,470	0,478
18	BLANCO	20 mg/l	0,519	0,525	0,512	0,503	0,515	0,526	0,516	0,526	0,498	0,472
19		Suma	1,507	1,531	1,506	1,492	1,521	1,496	1,470	1,478	1,460	1,436
20		Promedio	0,502	0,510	0,502	0,497	0,507	0,499	0,490	0,493	0,487	0,479
21		30 mg/l	0,738	0,766	0,726	0,696	0,720	0,685	0,688	0,690	0,682	0,659
22		30 mg/l	0,709	0,693	0,685	0,699	0,618	0,620	0,628	0,633	0,626	0,635
23	III	30 mg/l	0,672	0,676	0,699	0,708	0,677	0,689	0,683	0,686	0,623	0,616
24		Suma	2,119	2,135	2,110	2,103	2,015	1,994	1,999	2,009	1,931	1,910
25		Promedio	0,706	0,712	0,703	0,701	0,672	0,665	0,666	0,670	0,644	0,637
26		30 mg/l	0,696	0,690	0,705	0,754	0,773	0,761	0,744	0,746	0,735	0,733
27		30 mg/l	0,675	0,672	0,660	0,646	0,639	0,639	0,653	0,630	0,641	0,637
28	BLANCO	30 mg/l	0,717	0,724	0,728	0,668	0,662	0,663	0,659	0,672	0,665	0,663
29		Suma	2,088	2,086	2,093	2,062	2,081	2,063	2,056	2,048	2,041	2,033
30		Promedio	0,696	0,695	0,698	0,687	0,694	0,688	0,685	0,683	0,680	0,678

ANEXO 23. Valores estadísticos descriptivos en relación a diferentes concentraciones de carbofurán durante el ensayo de biodegradación, Ayacucho 2014.

Tratamiento	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Varianza	Asimetría	Curtosis		
	Estad.	Estad.	Estad.	Estad.	Estad.	Estad.	Estad.	Estad.	Error típico	Error típico	
CACAO 10 mg/l	10	10,10	2,30	12,40	6,3574	3,74733	14,043	,550	,687	-1,408	1,334
COCA 10 mg/l	10	7,73	3,85	11,58	6,9083	2,61750	6,851	,506	,687	-,804	1,334
CACAO 20 mg/l	10	8,41	13,85	22,26	17,5942	2,96023	8,763	,333	,687	-1,295	1,334
COCA 20 mg/l	10	5,75	15,73	21,48	18,5554	2,03283	4,132	,146	,687	-1,361	1,334
CACAO 30 mg/l	10	6,18	24,58	30,76	28,3961	2,14538	4,603	-,538	,687	-,837	1,334
COCA 30 mg/l	10	3,62	26,60	30,23	28,5073	1,31355	1,725	,004	,687	-1,586	1,334
N válido	10										

(según lista)

ANEXO 24. Prueba de Tukey para la comparación de diferencia entre las medias de los distintos tratamientos en relación a diferentes concentraciones de carbofurán en el ensayo de biodegradación con hongos aislados de suelos con cultivo de *Theobroma cacao* "cacao" y *Erythroxylum coca* "coca" respectivamente, Ayacucho 2014.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
10 mg/l	10	6,35740				
Blanco 10 mg/l	10		9,95170			
20 mg/l	10			17,59420		
Blanco 20 mg/l	10				20,69070	
30 mg/l	10					28,39610
Blanco 30 mg/l	10					29,29930
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,941

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

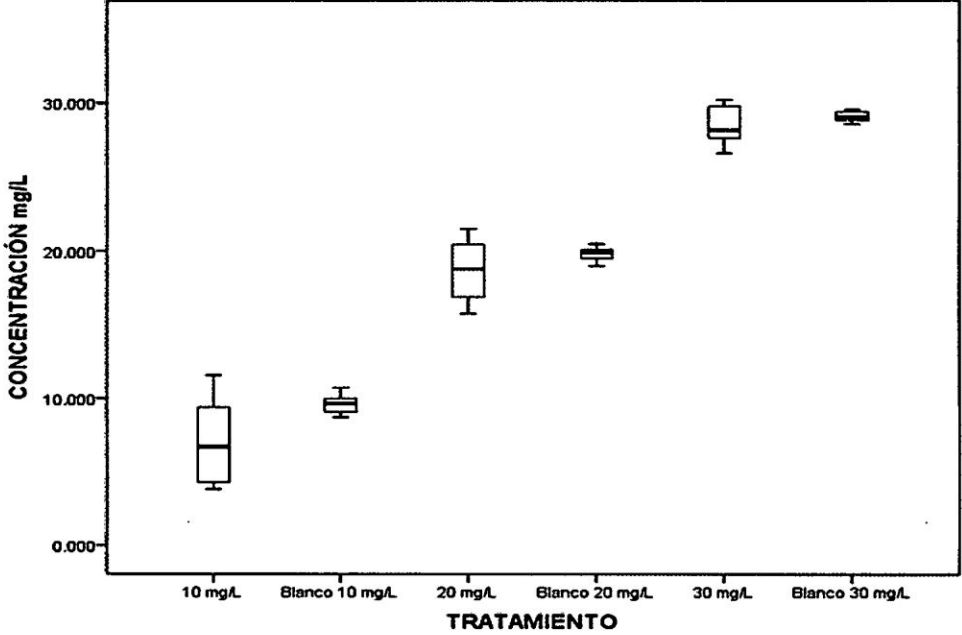
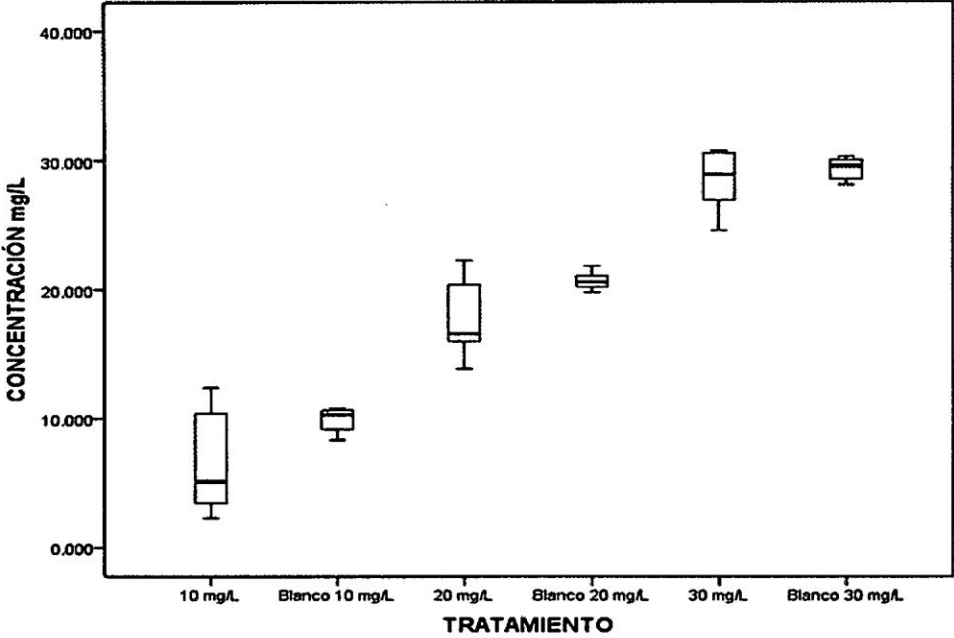
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
10 mg/l	10	6,90830			
Blanco 10 mg/l	10		9,61550		
20 mg/l	10			18,55540	
Blanco 20 mg/l	10			19,82120	
30 mg/l	10				28,50730
Blanco 30 mg/l	10				29,08700
Sig.		1,000	1,000	,417	,953

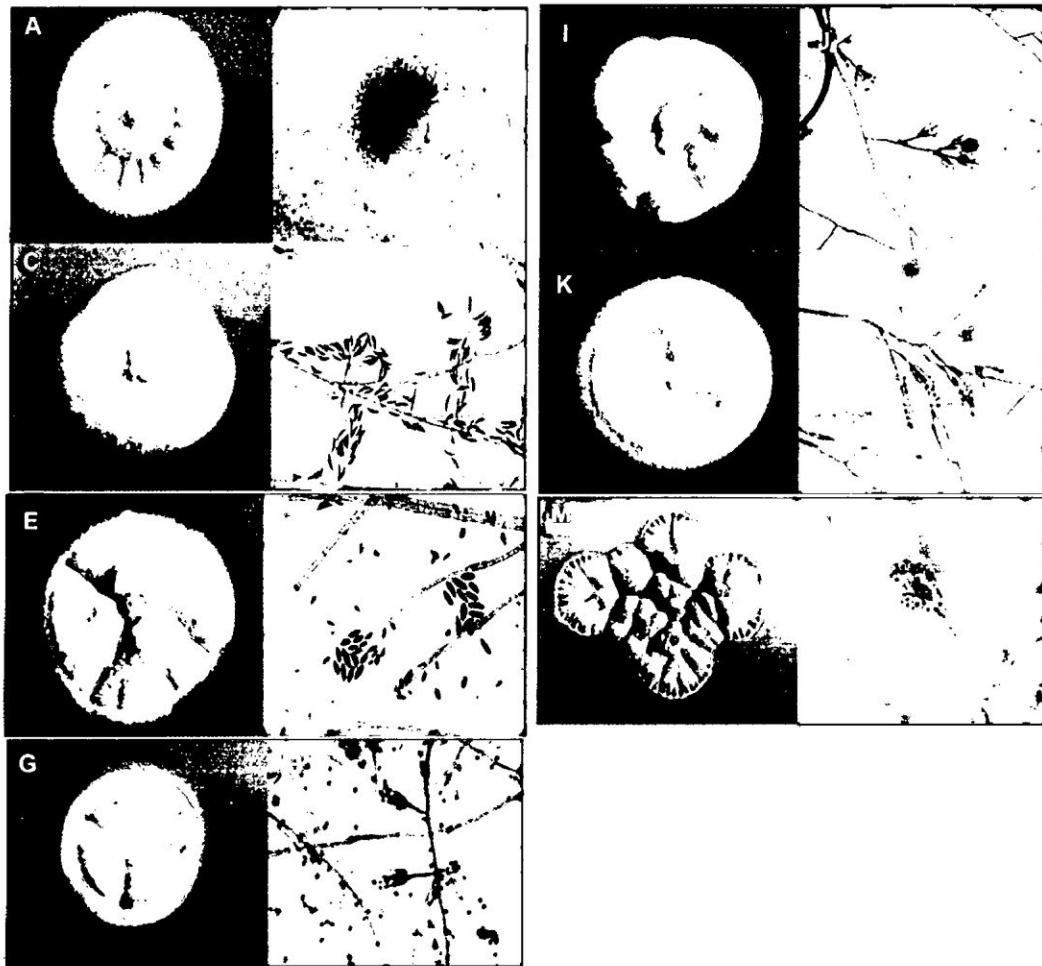
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000.

ANEXO 25. Gráfico de Box-Plot del ensayo de biodegradación de carbofurán por hongos aislados a partir de suelos con cultivos de *Theobroma cacao* "cacao" y *Erythroxylum coca* "coca" respectivamente. Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



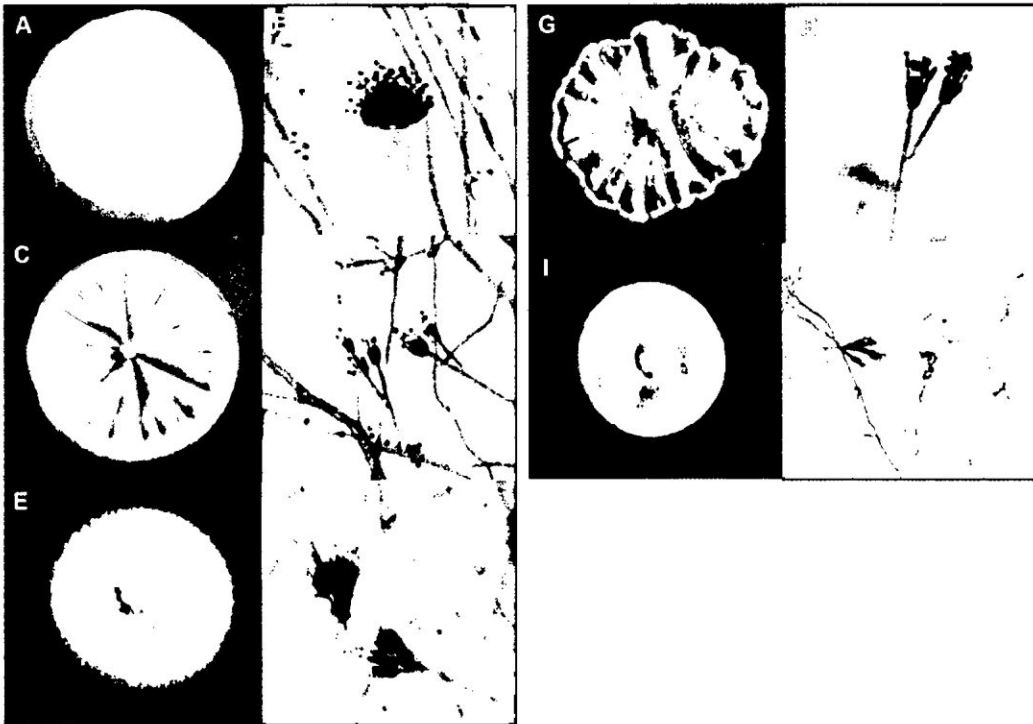
ANEXO 26. Hongos cultivados en agar Sabouraud, aislados a partir de suelos con cultivos de *Theobroma cacao* "cacao". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



Leyenda

A, *Aspergillus sp.* cepas I-12, I-15 y I-5; con colonia plana circular, color crema aterciopelado con borde blanco regular y micelio aéreo. En **B**, microscópicamente se observa conidióforo liso, de pared delgada, vesícula esférica con fiálides largos y conidios circulares. En **C** y **E** *Fusarium sp.* I-17, I-8 y I-13, colonia algodonosa elevada de color blanco (**C**) y rosado (**E**) con micelio aéreo, contrastadas microscópicamente en **D** y **F**, hifas hialinas septadas y delgadas, microconidias elipsoidales (**D**) en acúmulo. En **G**, **I** y **K**; se observa colonias con distintas caracterizas pertenecientes al género *Paecilomyces sp.* cepas I-14, I-11, I-9, I-6 y I-7; contrastadas por observación microscópica en **H**, **J** y **L**; se observa hifas hialinas septadas, conidióforos con ramificación irregular, fiálides solitarias en pares o multiples delgadas y largas (**L**) de base ancha y ápice estrecha, conidias elípticas a veces solitarias (**H** y **J**). En **M**, *Penicillium sp.* I-19, colonia aterciopelada, levantada, plegadas de color verde-gris. En **N**, al microcultivo se observa conidióforos hialinos, fiálides que nacen sobre métulas, conidias en cadena, esféricas, hialinas.

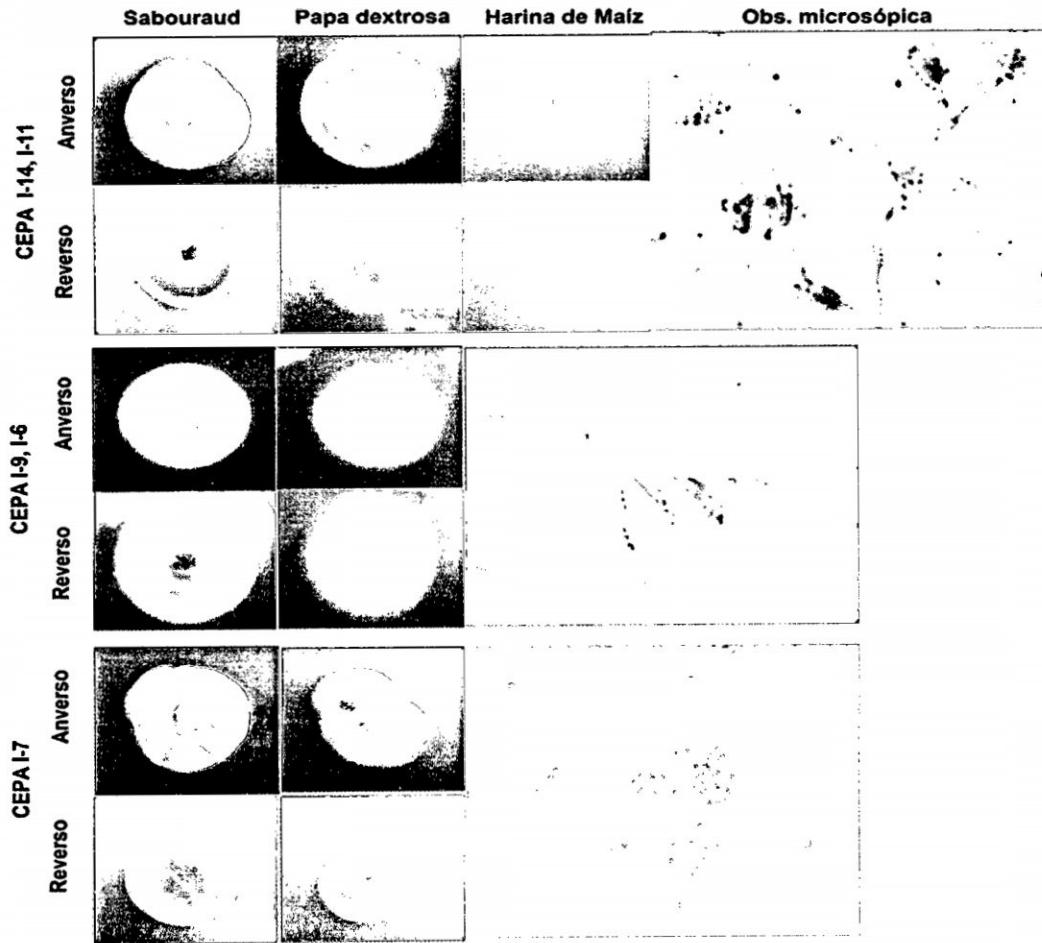
ANEXO 27. Hongos cultivados en agar Sabouraud, aislados a partir de suelos con cultivos de *Erythroxylum coca* "coca". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



Leyenda

A, *Aspergillus* sp. II-15, colonia plana circular de color blanco con borde regular y micelio aéreo algodonoso. En **B**, microscópicamente se observa conidióforo de pared delgada, vesículas en forma de clava y conidias esféricas. En **C**, **E** y **G** se observa colonias con distintas características pertenecientes al género *Penicillium* sp. II-6, II-3, II-5 y II-1; contrastadas por observación microscópica en **D**, **F** y **H** se observa conidióforos hialinos, filídes que nacen sobre métulas, conidias en cadena, esféricas y hialinas. En **I**, *Paecilomyces* sp. II-4, colonia plana circular de color rosado con borde regular y micelio aéreo algodonoso. En **J**, al microcultivo se observa hifas hialinas septadas, conidióforos con ramificación irregular, filídes en pares, delgadas y largas, conidias elípticas.

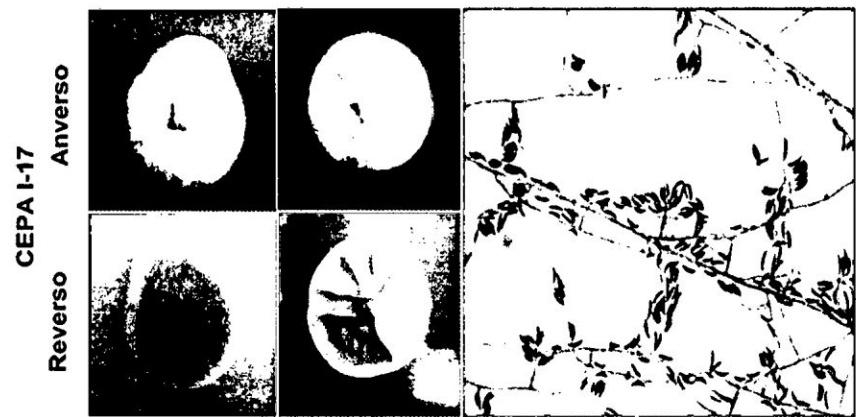
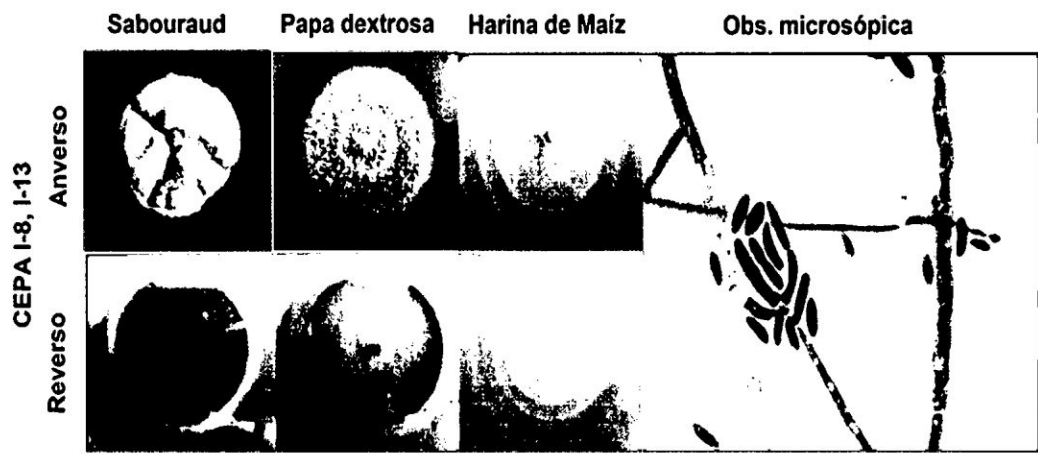
ANEXO 28. Cepas de hongos degradadores de carbofurán en tres medios de cultivos diferentes y su observación microscópica, aislados a partir de suelos con cultivo de *Theobroma cacao* "cacao". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



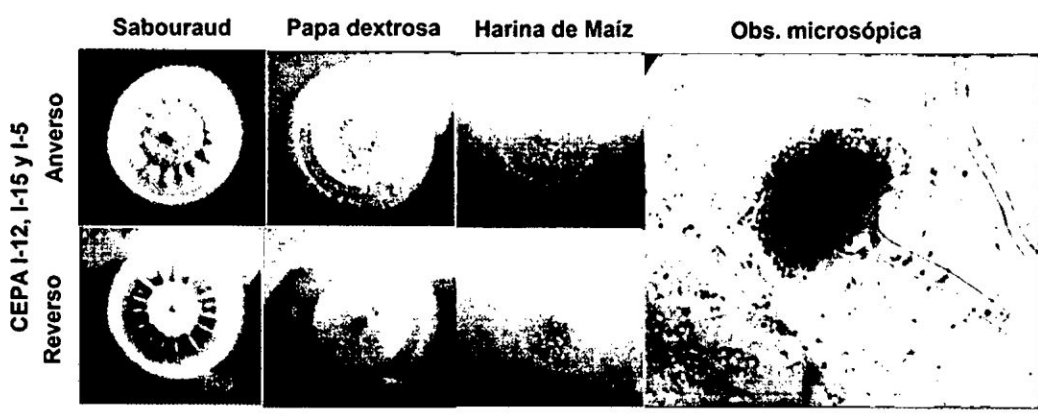
Cepas de tres géneros de *Paecilomyces sp.* degradadores de carbofurán.



Cepa *Penicillium sp.* degradador de carbofurán.

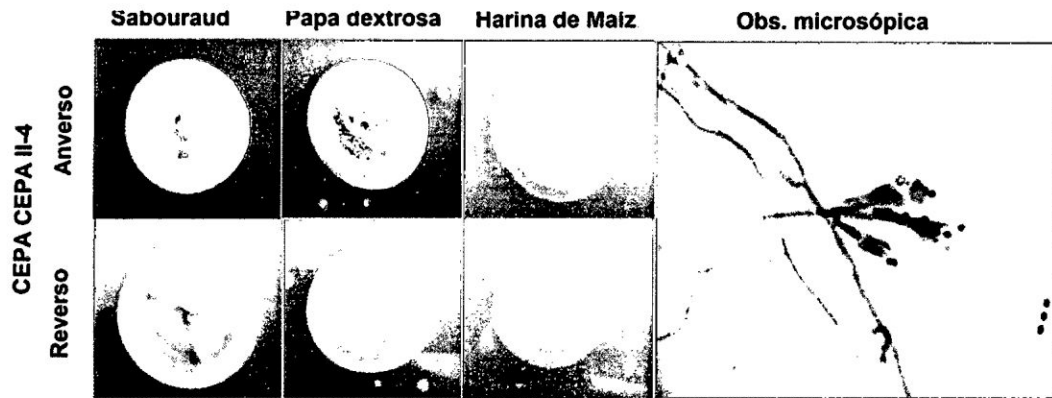


Cepas de *Fusarium sp.* degradadores de carbofurán

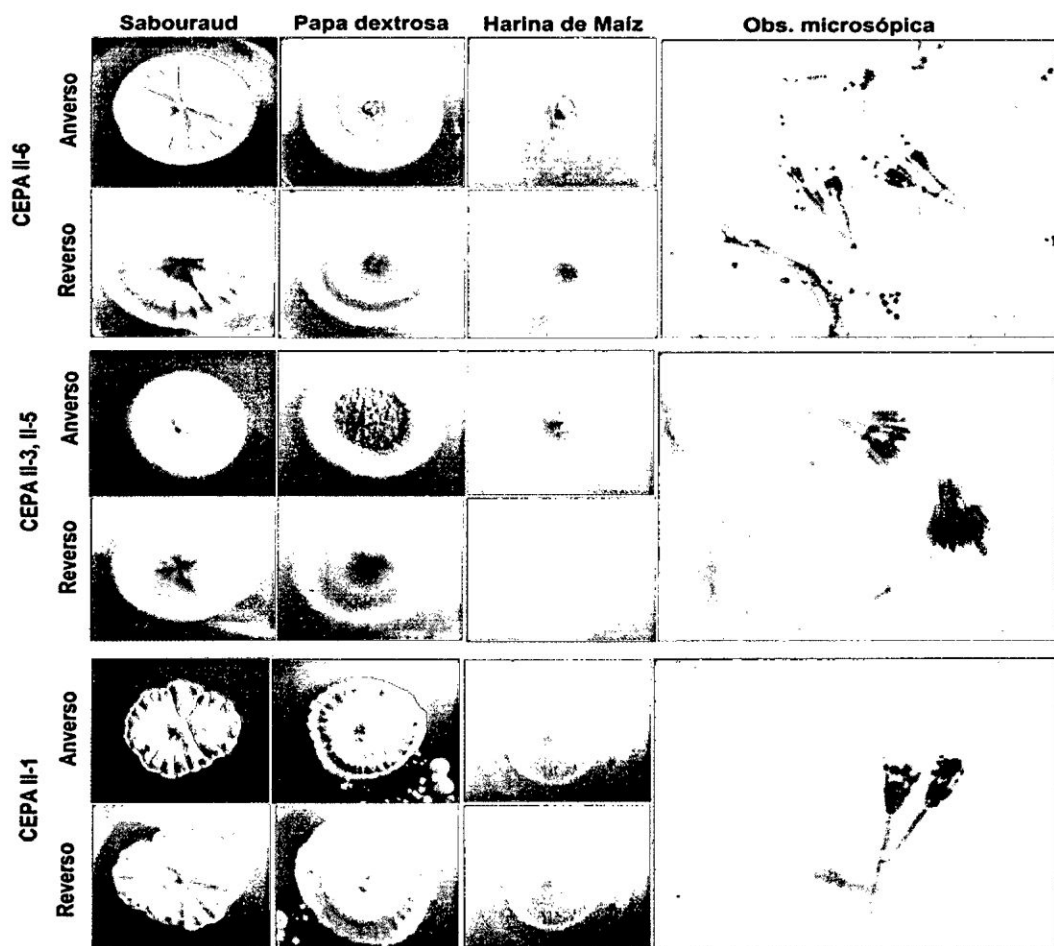


Cepas de *Apergillus sp.* degradadores de carbofurán

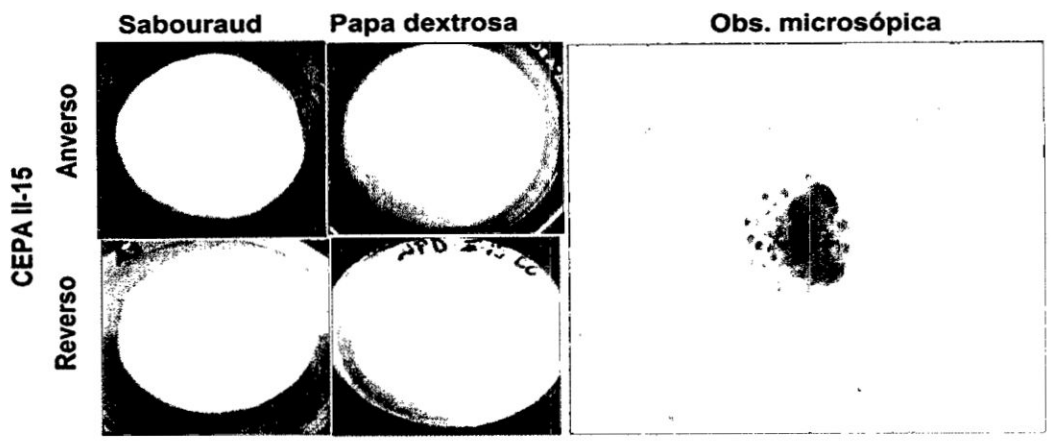
ANEXO 29. Cepas de hongos degradadores de carbofurán en tres medios de cultivos diferentes y su observación microscópica, aislados a partir de suelos con cultivo de *Erythroxylum coca* "coca". Santa Rosa-VRAEM, Ayacucho 2014.



Cepa de *Paecilomyces* sp. degradador de carbofurán



Cepas de *Penicillium* sp. degradadores de carbofurán



Cepa de *Aspergillus* sp. degradador de carbofurán

ANEXO 30. Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	MARCO TEORICO	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>1. PROBLEMA GENERAL ¿Tendrán capacidad degradadora de carbofurán los hongos aislados a partir de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013?</p> <p>2. PROBLEMA ESPECÍFICO ¿Se logrará aislar hongos con capacidad degradadora del carbofurán de suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013?</p>	<p>1. OBJETIVO GENERAL Determinar la capacidad biodegradadora del carbofurán por hongos aislados de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013</p> <p>2. OBJETIVO ESPECÍFICO Aislar hongos con capacidad biodegradadora del carbofurán de suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013</p>	<p>1. HIPOTESIS GENERAL La microbiota de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa ésta constantemente sometida a sustancias xenobióticas con diversos pesticidas como el carbofurán por lo que existe hongos degradadores del carbofurán.</p> <p>2. HIPOTESIS ESPECIFICAS Existen hongos con capacidad biodegradadora del carbofurán en suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013</p>	<p>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 1.1. Química de los pesticidas 1.1.1. Insecticidas organoclorados. 1.1.2. Insecticidas organofosforados 1.1.3. Insecticidas carbamatos. 1.1.3.1. Carbofurán. a. Usos b. Modo de acción c. Persistencia d. Efectos en el medio ambiente e. Efectos en la salud 1.2. Biorremediación 1.2.1. Tipos de biorremediación 1.2.2. Degradación microbiana de plaguicidas 1.2.3. Uso de hongos en la biorremediación. 2. ANTECEDENTES 2.1. Biodegradación del carbofurán por un hongo aislado de suelo tratado. 2.2. Biodegradación del carbofurán y fenol carbofurán por el hongo <i>Mucor ramannianus</i> y la identificación de los metabolitos. 2.3. Biodegradación de carbofurán por <i>Pichia anomala</i> cepa HQ-C-01 y su aplicación para la biorremediación de suelos contaminados. 2.4. Influencia y persistencia de los insecticidas carbofurán y forato sobre los microorganismos en el campo de arroz. 2.5. Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca. 2.6. Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la pudrición Blanca de la Madera. 2.7. Degradación de los plaguicidas por Hongos de pudrición blanca y su relación con el Potencial Ligninolítico.</p>	<p>1. VARIABLE PRINCIPAL: - Degradación del carbofurán <u>Indicador</u> - Concentración de carbofurán en mg/L.</p> <p>2. VARIABLE SECUNDARIO: - Transversal</p> <p>3. DISEÑO - Básico</p> <p>4. MÉTODO - Analítico</p> <p>5. POBLACIÓN <u>Indicador</u> - Género de Hongos degradadores de carbofurán</p>	<p>1. TIPO DE INVESTIGACIÓN - Descriptivo</p> <p>2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN - Básico</p> <p>3. DISEÑO - Transversal</p> <p>4. MÉTODO - Analítico</p> <p>5. POBLACIÓN Microbiota de suelos agrícolas del distrito de Santa Rosa</p> <p>6. MUESTRA Suelos Agrícolas y su microbiota con cultivos de cacao y coca sometidos con insecticidas, seleccionadas al azar en el distrito de Santa Rosa.</p> <p>7. TÉCNICA Método cromogénico de Dapsona</p>
<p>¿Cuál será la capacidad biodegradadora del carbofurán en mg/L por hongos aislados de suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013?</p> <p>¿Qué géneros de hongos tendrán capacidad degradadora del carbofurán aisladas de suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013?</p>	<p>Evaluar la capacidad biodegradadora del carbofurán en mg/L por hongos aislados de suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013</p> <p>Identificar los principales géneros de hongos con capacidad degradadora del carbofurán aislados de suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013</p>	<p>La concentración de carbofurán disminuye en mg/L por la capacidad degradadora de los hongos aislados de suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013</p> <p>La capacidad degradadora del carbofurán se manifiesta por los géneros más representativos de hongos degradadores de pesticidas aislados de suelos agrícolas con cultivos de cacao y coca del distrito de Santa Rosa VRAEM, Ayacucho 2013</p>	<p>2.1. Biodegradación del carbofurán por un hongo aislado de suelo tratado. 2.2. Biodegradación del carbofurán y fenol carbofurán por el hongo <i>Mucor ramannianus</i> y la identificación de los metabolitos. 2.3. Biodegradación de carbofurán por <i>Pichia anomala</i> cepa HQ-C-01 y su aplicación para la biorremediación de suelos contaminados. 2.4. Influencia y persistencia de los insecticidas carbofurán y forato sobre los microorganismos en el campo de arroz. 2.5. Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca. 2.6. Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la pudrición Blanca de la Madera. 2.7. Degradación de los plaguicidas por Hongos de pudrición blanca y su relación con el Potencial Ligninolítico.</p>	<p>- Género de Hongos degradadores de carbofurán</p>	<p>6. MUESTRA Suelos Agrícolas y su microbiota con cultivos de cacao y coca sometidos con insecticidas, seleccionadas al azar en el distrito de Santa Rosa.</p>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
CUSTODIA DE HUARAZ
BIBLIOTECA