

Universidad Católica Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Química del Medio Ambiente



**“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD BIODEGRADATIVA DE
Trichoderma sp. PARA PROFENOFOS”**

Tesis presentada por el Bachiller:

Cutipa Luque, Juan Miguel

Para optar el Grado Académico de:

Maestro en Química del Medio Ambiente

Asesor:

Dr. Dávila del Carpio, Gonzalo

**Arequipa – Perú
2017**

**DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE**

Sr. Dr.:

Hugo Tejada Pradell

Director de la Escuela de Postgrado de la UCSM

Presente-.

De mi mayor consideración:

En atención al nombramiento como Dictaminador del Borrador de Tesis presentado por el Bachiller Cutipa Luque, Juan Miguel con el que pretende optar el grado Académico de Maestro en Química del Medio Ambiente, debo informar que el trabajo intitulado "Estudio de la capacidad Biodegradativa de Trichoderma sp. para Profenofos", ha sido desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se han hecho las correcciones de forma y fondo correspondientes, encontrándose apto para su sustentación, por lo que doy mi dictamen aprobatorio.

Atentamente

Arequipa 31 de Octubre del 2017



Dr. Gonzalo Dávila del Carpio



INFORME No. 009-2017-LAPS

A : Dr. Hugo Tejada Pradell
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSTGRADO
Universidad Católica de Santa María - Arequipa

DE : Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.
Docente de la Escuela de Postgrado.
Universidad Católica de Santa María - Arequipa

ASUNTO : Informe y Opinión sobre el Borrador de Tesis para obtener el grado Académico de Maestro en Química del Medio Ambiente: "Estudio de la capacidad biodegradativa de *Trichoderma sp* para profenofos". Presentando por el Bachiller: Juan Miguel Cutipa Luque.


FECHA : Arequipa, 06 de Noviembre del 2017.

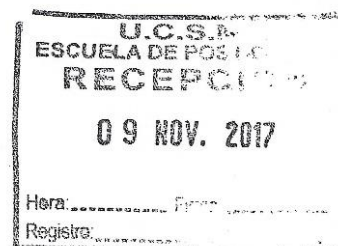
Tengo a bien dirigirme a usted, con la finalidad de informarle sobre el asunto, después de haber recibido, revisado y evaluado el Borrador de Tesis: "Estudio de la capacidad biodegradativa de *Trichoderma sp* para profenofos".

APRUEBO el presente Borrador de Tesis de Maestría, presentado por Presentando por el Bachiller: Juan Miguel Cutipa Luque.

Esperando se tome el conocimiento debido, me despido dispuesto a continuar contribuyendo en la implementación del Borrador de Tesis para optar el grado Maestro en Química del Medio Ambiente.

Atentamente,


Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.



ESCUELA DE POST-GRADO

MAESTRIA EN QUIMICA DEL MEDIO AMBIENTE

Exp. Nro. 20160000048416


DICTAMEN DE TESIS: ESTUDIO DE LA CAPACIDAD BIODEGRADATIVA DE *Trichoderma sp* para PROPENOFOS

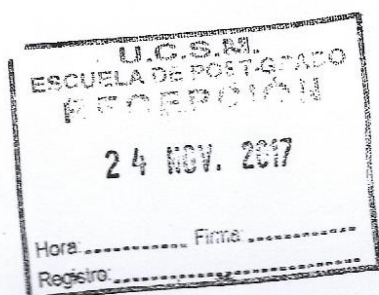
Bachiller: CUTIPA LUQUE, JUAN MIGUEL

Es recomendable que las figuras sean presentadas o hacer un breve comentario antes de mostrarlas, por ejemplo en la pág. 25 y 26 con la fig. 6. Al igual que la fig. 7 en la pág. 28. En la pág. 34, se menciona a la fig. 6, pero parece ser la fig. 8. Presentar la fig. 12, pág. 48. Revisar la fig. 13. Revisar la presentación de la tabla 07 en la pág. Revisar la tabla 6 en la pág. 55. Poner una adecuada presentación de la Fig. 18, p.58. En la pág. 58 menciona a la tabla 3, cuando al parecer es la tabla 8.

Pág. 66, en el segundo párrafo se menciona a la tabla 8, pero esto no corresponde. Revisar esta parte. Se sugiere incluir un glosario de términos para un mejor entendimiento. Por ejemplo, en la pág. 67, se menciona a PO. Pág. 71, parece que la tabla 20 no corresponde.

Recomendación Final: Debe de hacerse una revisión completa en lo referente a redacción y ortografía. Asimismo, se debe evaluar el orden de las tablas y figuras pues algunas no concuerdan. Hechas estas correcciones el trabajo está apto para su sustentación.


Jaime Cardenas García, PhD
Cod. 0838





DEDICATORIA

A Dios y a mis padres.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por el financiamiento económico mediante el convenio 033-2015, que me permitió culminar de manera satisfactoria la Maestría en Química del Medio Ambiente y el presente trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecerte a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado. A la UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional. A mi asesor de tesis, Dr. Gonzalo Davila del Carpio por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito. También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con mi formación, y en especial a mis profesores el Dr. Jaime Cardenas Dr. Luis Ponce por sus consejos, su enseñanza. Y mi especial agradecimiento a mi profesor de Investigación y de Tesis de Grado, Dr. Jose Villanueva por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudan a formarte como persona e investigador. Quiero agradecer a mi familia que siempre me apoyaron y brindaron consejos para poder culminar mis estudios y seguir adelante.

INTRODUCCIÓN

EL incremento de la población mundial y la mayor demanda de alimentos llevan al aumento y la sostenibilidad de la producción de los mismos a través de la agricultura intensiva, la atención de la salud pública y la utilización adecuada de los recursos naturales. La mejora de la agricultura con tecnología agrícola avanzada para satisfacer esta demanda, manteniendo el suelo en su calidad productiva, juega un papel dominante en buena parte de la productividad actual. La preocupación por la contaminación de plaguicidas en el medio ambiente en el actual contexto de uso de plaguicidas ha asumido una gran importancia. (1)

Según el SENASA en los últimos años (2012) la venta de plaguicidas agrícolas en el Perú ha sido estimada entre 160- 190 millones de dólares anuales: Insecticidas: \$ 68 millones; Fungicidas: \$ 60 millones; Herbicidas: \$ 9 millones. En el 2014 Perú ha importado un total de 3 826,8 toneladas (TM) de insecticidas, en Arequipa el subsector agrícola viene a ser una de las actividades económicas más importantes de este.

La aplicación de los plaguicidas y los residuos generados, su mal manejo y disposición incontrolada, son las principales causas de contaminación ambiental, principalmente del recurso suelo, debido a su elevada adsorción sobre la materia orgánica, su baja volatilidad y estabilidad química, que les confiere un bajo grado de movilidad y una elevada persistencia. A pesar de estas características, la volatilización y la disolución en cuerpos de agua son importantes mecanismos de dispersión de la contaminación. (2) La vida media de un organofosforado en el suelo puede ser de hasta un año, dependiendo del clima, la dosis y las otras condiciones ambientales (3)

Los residuos de pesticidas pueden permanecer en el suelo por diferentes períodos de tiempo según las características del suelo, convirtiéndose en un riesgo de salud pública y ambiental. La mayoría de los pesticidas tienen un efecto adverso sobre la diversidad funcional de la microflora del suelo y en última instancia sobre la fertilidad del suelo y el crecimiento vegetal, lo cual pone en seria amenaza la sostenibilidad de los suelos agrícolas. (4)

El destino de los plaguicidas en el medio ambiente se ha convertido en una preocupación ambiental debido a que estos plaguicidas llegan a organismos que no son el objetivo principal siendo dañados(5). Potencialmente debido a los efectos adversos de los pesticidas químicos en los microorganismos del suelo (6) puede afectar la fertilidad del suelo (7) . Un plaguicida ideal debe ser tóxico sólo para el organismo objetivo, los residuos biodegradables e indeseables no deben afectar las superficies no objetivo.

En los últimos tiempos se ha dirigido la atención al estudio de los aspectos de calidad del suelo y están referidos a aquellos que permiten al suelo aceptar, almacenar y reciclar agua, nutrientes y energía. La calidad del suelo no depende sólo de las propiedades físicas, fisicoquímicas y químicas del suelo, sino que está estrechamente relacionada con las propiedades microbiológicas del mismo (8)

Existe la necesidad de satisfacer la demanda mundial de alimentos y ninguna otra alternativa puede competir con los pesticidas y productos agroquímicos para ser utilizada en una escala tan grande en la agricultura. La lenta degradación de los plaguicidas en el medio ambiente y el uso extensivo o inapropiado por los agricultores pueden conducir a la contaminación ambiental del agua, el suelo, el aire, varios tipos de cultivos e indirectamente a los seres humanos. (9, 10)

Varios estudios realizados demuestran que el uso de cepas fúngicas degradan de manera satisfactoria pesticidas como es el caso de Bruna que evaluó el crecimiento y desarrollo de los hongos de origen marino *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* y *Trichoderma harzianum* aislados de ascidia marina *Didemnum ligulum*, en presencia de pentaclorofenol (PCP).(11) También Tejomyee y colaboradores aislaron hongos capaces de metabolizar endosulfán.(12)

Se realizaron varios estudios para examinar la degradación de plaguicidas en el suelo, el suelo recibe diversos plaguicidas la población microbiana existente en este podría adaptarse a estos pesticidas o ser capaz de degradarlo a través de la liberación de enzimas y puede servirle como una fuente de nutrientes. (13, 14)

Los enfoques generales para la biorremediación están orientados a la biodegradación natural por los organismos nativos (biorremediación intrínseca), para llevar la modificación del medio ambiente mediante la aplicación de nutrientes o aireación (bioestimulación) o mediante la adición de microorganismos (Bioaumentación).

Con el presente trabajo buscamos evaluar la capacidad de biodegradación de profenofos por parte de *Trichoderma sp*, como una alternativa de bajo costo y amigable con el ambiente que pueda solucionar o mitigar los impactos ambientales ocasionados por la contaminación con profenofos. Se aislaron cepas de *Trichoderma sp*, de suelo agrícola, estas se cultivaran en medios de cultivo contaminados con profenofos a concentraciones conocidas y se medirá el nivel de degradación.



RESUMEN

El uso de pesticidas como Profenofos en el sector agrícola de la región de Arequipa, en la producción de los principales cultivos se ve aumentada debido a la múltiple presencia de plagas que amenazan la producción de estos y el desconocimiento del correcto uso de parte de los agricultores, lo que hace que los suelos de la región se vean contaminados por la residualidad y persistencia que estos presentan. La finalidad de este trabajo de investigación fue evaluar la capacidad de biodegradación de *Trichoderma sp.*, sobre profenofos. Para la cuantificación de profenofos se usó un método validado de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-DAD) usando estándar primario de profenofos con pureza mayor al 99.5 % Sigma Aldrich.

Los ensayos de biodegradación fueron realizados en medio de cultivo líquido (Papa, Dextrosa y Agua) donde se inoculó conidios del hongo a razón de $1E+6$ y $1E+4$ unidades por mililitro de medio; se dejó en incubación durante 3 días; y luego se contaminó con una concentración inicial de profenofos a 10 y 30 mg /L, se dejó desarrollar el hongo en el medio por 21 días a 15 y 25 °C. Se obtuvo que el mejor porcentaje de biodegradación fue de 97.60% para el tratamiento con 10 mg/L profenofos $1E+4$ conidios y 25 °C, y el menor porcentaje de biodegradación, para el tratamiento con 30 mg/L profenofos $1E+4$ conidios y 15 °C con 57.99%.

Trichoderma sp aceleró el proceso de biodegradación, lo cual indica que esta cepa de hongo presenta un desempeño bastante favorable en el proceso de biodegradación de profenofos.

Palabras Clave: Profenofos, HPLC-DAD, *Trichoderma sp* conidios, dextrosa y Biodegradación

SUMMARY

The use of pesticides in the agricultural sector of the Arequipa region in the production of the main crops has been increased due to the variety of the presence of pests that the production of these and the ignorance of the correct use of the part of the farmers, make the soils of the region are contaminated by the residuality and persistence that they present. The purpose of this research is to stimulate the biodegradation capacity of *Trichoderma sp.*, in profenofos, for the quantification of profenofos used to validate method in High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) at 99.5% Sigma Aldrich.

The biodegradation assays were done in the middle of the liquid culture (potato, dextrose and water), inoculated conidia from a fungus in two concentration $1E + 6$ and $1E + 4$ units per milliliter of medium; was allowed to incubate for 3 days; and then contaminated with an initial concentration of 10 and 30 mg / L, the fungus develops in the medium for 21 days at 15 and 25 ° C. The best percentage of biodegradation was 97.60% for the treatment with 10 mg / L profenofos $1E + 4$ conidia and 25 ° C, and the lowest percentage of biodegradation, for the treatment with 30 mg / L profenofos $1E + 4$ conidia and 15 ° C with 57.99%.

Trichoderma sp accelerated the biodegradation process, indicating that this fungus strain has a rather favorable performance in the biodegradation process of profenofos.

Keywords: Profenofos, HPLC-DAD, *Trichoderma sp* conidia, dextrose and Biodegradation

INDICE GENERAL

DEDICATORIA
AGRADECIMIENTOS
INTRODUCCIÓN
SUMMARY
HIPÓTESIS
OBJETIVOS

CAPITULO I MARCO TEORICO	1
1.1. LA CONTAMINACIÓN DE SUELO	1
1.2. LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA.....	1
1.3. PLAGUICIDAS.....	1
1.3.1. Clasificación de plaguicidas.....	2
1.3.2. Problemática general del uso de plaguicidas	4
1.3.3. Efectos ambientales.....	5
1.3.4. Efectos sobre la salud humana	6
1.4. ORGANOFOSFORADOS.....	7
1.4.1. Profenofos.....	9
1.5. Trichoderma sp.....	10
1.5.1. Taxonomía.....	11
1.5.2. Descripción del género	11
1.6. BIODEGRADACIÓN	14
CAPITULO II MATERIALES Y METODOS.....	17
2.1. LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO INVESTIGACIÓN.....	17
2.2. UNIDADES DE ESTUDIO.....	17
2.3. EQUIPOS.....	17
2.4. MATERIALES.....	18
2.5. REACTIVOS.....	19
2.6. METODOLOGÍA	19
2.6.1. Recolección de muestra.....	20
2.6.2. Aislamiento de <i>Trichoderma sp.</i>	20
2.6.3. Purificación de la cepa.....	21
2.6.4. Identificación de la cepa	21
2.6.5. Preparación del estándar secundario de Profenofos	23

2.6.6.	Preparación del medio de cultivo.....	24
2.6.7.	Unidades experimentales.....	24
2.6.8.	Ensayo de biodegradación.....	25
2.6.9.	Ensayo de cinética de biodegradación.....	25
2.6.10.	Análisis de profenofos por Cromatografía Líquida de Alta resolución.....	26
2.6.11.	Análisis estadístico.....	28
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		31
3.1.	TOMA DE MUESTRAS.....	31
3.2.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	32
3.2.1.	Características de la colonia.....	32
3.2.2.	Características microscópicas.....	32
3.3.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	33
3.4.	INSCRIPCIÓN DE LA CEPA A GENBANK.....	36
3.5.	DETECCIÓN DE LA CEPA FÚNGICA.....	36
3.6.	TOLERANCIA DE PROFENOFOS PARA <i>Trichoderma sp.</i>	36
3.7.	EXTRACCIÓN DE PROFENOFOS DEL MEDIO DE CULTIVO.....	39
3.8.	CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE PROFENOFOS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO.....	42
3.8.1.	Biodegradación de profenofos por la cepa de hongo <i>Trichoderma sp.</i>	42
3.8.2.	Modelo cinético de degradación.....	46
3.9.	BIODEGRADACIÓN DE PROFENOFOS.....	48
3.10.	EFEECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CEPA FÚNGICA.....	53
3.11.	DIAGRAMA DE PARETO.....	54
CONCLUSIONES.....		55
RECOMENDACIONES.....		56
BIBLIOGRAFIA.....		57
ANEXOS.....		64

REFERENCIA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

HPLC-DAD: Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Detector de Diodos.

ITS: Internal transcribed spacer

NCBI: National Center for Biotechnology Information

OP/OPs: Organofosforados

PDA: Papa, dextrosa y Agar

PD: Papa y Dextrosa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

UV: Ultravioleta

UFC: Unidad formadora de colonia

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de plaguicidas a) organofosforado; b) carbamato; c) piretroide; d) organoclorado.	2
Figura 2 Mecanismo de acción de pesticidas organofosforados(38)	7
Figura 3. Estructura general de los organofosforados. X representa el grupo saliente, R1 y R 2 es el grupo lateral, normalmente alcoxi. (43).....	8
Figura 4 Esquema de inhibición de la acetilcolinesterasa (38).....	9
Figura 5 Estructura molecular de profenofos.....	10
Figura 6 Colonia <i>Trichoderma harzianum</i> , (46).....	11
Figura 7 Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma harzianum</i> (20um) (46).....	13
Figura 8 Flujograma de la metodología de trabajo.	19
Figura 9 Esquema de la forma de muestreo en campo. (Fuente propia).....	20
Figura 10 Mapa satelital del lugar de muestreo (Tomado de Google Earth).	31
Figura 11 Cepa del hongo <i>Trichoderma sp.</i>	32
Figura 12 Características microscópicas de <i>Trichoderma sp.</i>	33
Figura 13 Relación filogenética del aislamiento de <i>Trichoderma</i> inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1). La filogenia fue inferida por el programa BLAST la barra de escala 0.001 sustituciones por sitio.....	35
Figura 14 Ensayo de tolerancia para el hongo <i>Trichoderma sp.</i>	36
Figura 15 Tasa de crecimiento micelial de <i>Trichoderma sp.</i>	37
Figura 16 Curva de calibración estándar profenofos.....	40
Figura 17 Cromatograma a 210 nm correspondiente a profenofos en la muestra de medio de cultivo liquido con tiempo de retención de 3.2 min.....	41
Figura 18 Cinética de degradación profenofos por la cepa fúngica.....	42
Figura 19 Biodegradación de Profenofos a 25°C vs el modelo cinético de degradación propuesto por Origin Pro.	47
Figura 20 Cromatograma en HPLC de la degradación de profenofos.....	49
Figura 21 Diagrama de Pareto para la biodegradación de profenofos.....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Diagrama experimental que se aplicó para desarrollo de la investigación.	25
Tabla 2 Valores de las variables elegidas para la determinación del diseño factorial en el proceso de biodegradación de profenofos.	28
Tabla 3 Matriz de trabajo obtenida del diseño factorial multinivel, con todas las combinaciones posibles de los niveles de cada variable.	30
Tabla 4 Reporte taxonómico al que pertenece la secuencia procedente del aislado de <i>Trichoderma sp.</i> , y las similitudes de este con otras secuencias, procesadas por el programa BLAST.	35
Tabla 5 Crecimiento de micelio de <i>Trichoderma sp.</i> frente a diferentes concentraciones de profenofos en medio solido (PDA)	38
Tabla 6: Determinación de gráficos de calibración estándar profenofos en HPLC.	40
Tabla 7 Extracción liquido-liquido de profenofos cuantificadas en HPLC.	41
Tabla 8 Cinética de degradación de profenofos.	43
Tabla 9 Biodegradación de Profenofos a 25 °C, valores cuantificados por HPLC – DAD vs curva de ajuste de Origin Pro	46
Tabla 10 Valores obtenidos al analizar los datos en Origin 8.0 y descripción de la ecuación.	47
Tabla 11 Diseño factorial completo: Factores: pesticida, inóculo y temperatura.	48
Tabla 12 Degradación de profenofos por <i>Trichoderma sp.</i> A los 21 días.	53





HIPÓTESIS

Debido a los antecedentes que existen sobre la actividad de *Trichoderma sp.*, en la degradación de contaminantes ambientales; es probable que este hongo tenga la capacidad e influya específicamente en la degradación del pesticida profenofos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad de biodegradación de *Trichoderma sp.*, sobre pesticidas organofosforados como profenofos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar e identificar la cepa del hongo *Trichoderma sp.*, morfológica y molecularmente.
- Medir el desarrollo de biomasa fúngica de *Trichoderma sp.*, (conidios, micelio) ante la presencia de profenofos.
- Evaluar a la capacidad de biodegradación de *Trichoderma sp.*, sobre profenofos a diferentes concentraciones.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1. LA CONTAMINACIÓN DE SUELO

Siendo el suelo un recurso importante en el planeta tierra, este se degrada de diversas formas. Los metales pesados, pesticidas, la basura municipal, industria papel, plástico y materia orgánica. (15) El efecto de la contaminación puede dar como resultado la pérdida de la biodiversidad y el mal funcionamiento de la tierra como nutriente cíclico, etc. Los metales pesados también inhiben la actividad microbiana. (16)

1.2. LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA.

El agua es sin duda el recurso más importante en el planeta tierra proporcionando el hábitat único a la variedad de organismos. Los niveles de contaminación en los ecosistemas de las aguas han dado lugar a la pérdida de contenido de agua fresca en planeta tierra. El uso excesivo de fertilizantes, herbicidas y pesticidas causan graves daños a la vida presente en las aguas, entre los pesticidas, el 98% de estos fueron clasificados como muy tóxicos para los peces y crustáceos.(17)

1.3. PLAGUICIDAS.

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias que se usan de manera intensiva para controlar plagas agrícolas e insectos vectores de enfermedades en humanos y en los animales, así como, para el control de insectos y ácaros que afectan la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y alimento para animales. (18) Sin embargo, se reconoce que son sustancias químicamente complejas, que una vez aplicadas en el ambiente, están sujetas a una serie de transformaciones a nivel físico, químico y biológico (fenómenos de adsorción y absorción sobre suelos y plantas, volatilización, fotólisis y degradación química o microbiana). Además que también pueden ser arrastrados por las corrientes de aire y agua, que permiten su transporte a grandes distancias; hay que añadir que los residuos volátiles pasan a la atmósfera y regresan con la lluvia a otros lugares.(19) Estas transformaciones

pueden conducir a la generación de fracciones o a la degradación total de los compuestos que en sus diversas formas pueden llegar a afectar en los diferentes niveles de un ecosistema. (20)

1.3.1. Clasificación de plaguicidas

Debido a la gran cantidad de químicos y pesticidas, las combinaciones de compuestos han sido clasificadas para uso en insecticidas, acaricidas, herbicidas, nematocidas, fungicidas, moluscicidas y rodenticidas. La Organización Mundial de la Salud propuso una clasificación basada en su riesgo para la salud, basada en su comportamiento tóxico en ratas y otros animales de laboratorio mediante la administración oral y dérmica y la estimación de la dosis letal media (LD50) que produce la muerte en el 50%. Este orden de clasificación de menor a mayor toxicidad en los números I a IV, siendo extremadamente tóxico, altamente tóxico, moderadamente tóxico, ligeramente tóxico, respectivamente.(21),(22)

De acuerdo con su estructura química, los pesticidas se clasifican en diferentes familias, que van desde compuestos organoclorados y organofosforados hasta compuestos inorgánicos. En este trabajo, nos referimos sólo a algunas familias de plaguicidas relevantes por el daño que causan a la salud humana y alta demanda para su uso. La forma más común de clasificarlas en función de su estructura química y se divide en cuatro grupos principales (figura 1):

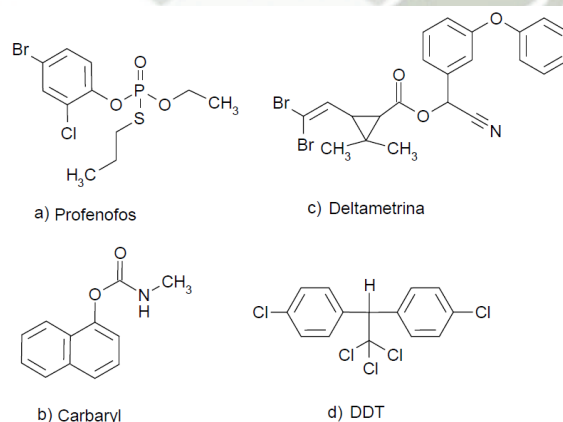


Figura 1 Estructura de plaguicidas a) organofosforado; b) carbamato; c) piretroide; d) organoclorado.

Organoclorados.

Son compuestos estables, demasiado persistentes en el medio ambiente y tienden a acumularse en el tejido graso humano y en el suero sanguíneo como el DDT (23), su principal uso es la erradicación de vectores de enfermedades como la malaria y el dengue. También se utilizan en el cultivo de uvas, lechuga, tomate, alfalfa, maíz, arroz, sorgo, algodón y madera, para su conservación. Su forma de exposición principalmente en los insectos esta por contacto o por ingestión(24). En humanos, estas sustancias o sus metabolitos actúan principalmente a nivel del sistema nervioso central alterando las propiedades electrofisiológicas y las membranas neuronales enzimáticas, provocando alteraciones en la cinética del flujo de Na^+ y K^+ a través de la membrana de la célula nerviosa(25), causando síntomas como convulsiones y muerte por envenenamiento agudo por paro respiratorio(26).

Organofosforados.

Son ésteres derivados del ácido fosfórico. En los seres humanos actúan sobre el sistema nervioso central inhibiendo la acetilcolinesterasa, una enzima que modula la cantidad y los niveles del neurotransmisor acetilcolina, interrumpiendo el impulso nervioso por fosforilación de serina del grupo hidroxilo en el sitio activo de la enzima (27). Los síntomas están causando pérdida de reflejos, dolor de cabeza, mareos, náuseas, convulsiones, coma e incluso la muerte(28); también se describen con propiedades alquilantes (29), que desde el punto de vista de la mutagénesis es primordial porque actúan directamente sobre el ácido desoxirribonucleico añadiendo grupos alquilo metil y etilo en las bases del ADN (30). Los compuestos organofosforados son comúnmente utilizados en la agricultura, la mayoría de estos son insecticidas y acaricidas, su forma de acción en estos organismos es por ingestión y contacto, se utilizan en cultivos hortícolas, árboles frutales, granos, algodón, caña de azúcar, entre otros.

Carbamatos.

Son ésteres derivados de ácidos o ácido *dimetil-N-metil carbámico*; como insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematicidas. Son menos persistentes que los organoclorados y los organofosforados y también estos últimos inhiben la acetilcolinesterasa. Sin embargo, en el caso

de los carbamatos, la acción es rápida y la cinética de bloqueo es a través de la carbamilación de la enzima mediante la unión covalente de grupos electrófilos de sitios carbamoilo estéricos de la enzima.(31)

Piretroides.

Se originan de insecticida natural derivado de extracto de piretro derivado de flores de crisantemo, conocido como piretrinas. Posteriormente se obtuvieron sintéticamente y actualmente se fabrican alrededor de 100 productos comerciales diferentes(27). Su exposición en los insectos es por contacto o ingestión. Actúan sobre el sistema nervioso central causando cambios en la dinámica de los canales de Na^+ en la membrana de la célula nerviosa, haciendo que aumente su tiempo de apertura, prolongando la corriente de sodio a través de la membrana tanto en insectos como en vertebrados(28). Estos eventos pueden conducir a la hiperexcitación neuronal(25, 28).

Otros.

Además, otros pesticidas son herbicidas de triazina, ureico, hormonal, amidas, compuestos nitro, benzimidazoles, ftalamidas, compuestos de bupiridilo, dibromuro de etileno, compuestos que contienen azufre, cobre o mercurio, entre otros.

1.3.2. Problemática general del uso de plaguicidas

La agricultura moderna ha ido aumentando progresivamente la utilización de productos químicos, no sólo con la finalidad de aumentar la productividad de los sistemas agrícolas, sino también para evitar su disminución debido a prácticas de manejo inadecuadas. Esta tendencia generó paquetes tecnológicos, en los cuales el uso de insumos químicos es el principal componente del sistema productivo. En tal sentido, los plaguicidas corresponden a un amplio espectro de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas utilizadas para el control de plagas y enfermedades en las actividades agropecuarias y forestales. El término plaguicidas engloba los insecticidas, nematocidas, herbicidas, fungicidas,

rodenticidas, agentes reguladores del crecimiento y agentes para el raleo de la fruta(32).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los países desarrollados utilizan el 75 % de los plaguicidas producidos a nivel mundial. Sin embargo, alrededor de dos millones de personas se intoxican anualmente por plaguicidas, en los países subdesarrollados(33). Estas cifras han ido cambiando significativamente dado que los países subdesarrollados han experimentado un importante crecimiento de los mercados para estos productos, en función de las fuertes demandas externas de productos agrícolas. Esto conllevó a un aumento en la cantidad de plaguicidas empleados así como en el número y la frecuencia de las aplicaciones.

1.3.3. Efectos ambientales

Cuando un plaguicida es aplicado a un cultivo, solamente alcanza el organismo “blanco” aproximadamente el 1%, mientras que el 25 % es retenido en el follaje, el 30 % llega al suelo y el 44 % restante es exportado a la atmósfera y a los sistemas acuáticos por escorrentía y lixiviación(34). El uso inadecuado de los plaguicidas puede provocar problemas bio-ecológicos y contaminación ambiental; para el primer caso menciona la eliminación de enemigos naturales de plagas y enfermedades, resistencia a las mismas, surgimiento de nuevas especies como plagas y eliminación de fauna útil, entre otros. Algunas poblaciones de organismos controlados naturalmente, al ser eliminados sus parásitos o depredadores por los plaguicidas, aumentan su número hasta niveles de importancia económica, constituyéndose en una plaga. Por otra parte, la aplicación masiva de plaguicidas puede generar resistencia de las plagas, lo que provoca que al cabo de algunos años el producto sea ineficiente, aún a dosis más elevadas o aplicaciones más frecuentes. Con relación a la contaminación ambiental, el deterioro de la calidad del agua es uno de los mayores problemas asociados al uso de plaguicidas. Este puede ser debido a alguna de las siguientes causas: Deriva de pulverizaciones, lixiviación y percolación hacia napas

freáticas, lavado de equipos y elementos de aplicación en fuentes de agua, mala eliminación de desechos de plaguicidas y envases, rotura de envases y accidentes con vuelco de productos hacia fuentes de agua (35). La contaminación de suelos puede ser debido a la aplicación directa de plaguicidas (herbicidas pre-emergentes), al escurrimiento de un pulverizado desde la planta hacia el suelo, a la deriva de las pulverizaciones y a la inadecuada eliminación de restos de pulverizaciones o de envases. (36)

1.3.4. Efectos sobre la salud humana

Los tipos de plaguicidas en uso varían entre países y en el tiempo. En algunos países en desarrollo la tendencia es similar a la de los países industrializados, donde se consume una mayor proporción de herbicidas y fungicidas. En cambio, en los países menos desarrollados los insecticidas altamente tóxicos continúan siendo los principales agroquímicos en uso.

En estos países ha fallado el sistema de registro como estrategia para manejar el riesgo, por lo que su población continúa expuesta a grandes cantidades de plaguicidas altamente tóxicos, inclusive prohibidos o severamente restringidos en países desarrollados (36).

Si bien los fungicidas y herbicidas tienen una menor toxicidad y se ubican en las categorías III y IV, tienen un mayor riesgo carcinogénico y teratogénico(36). En términos generales, la mayoría de las intoxicaciones humanas por plaguicidas ocurren debido a exposición laboral durante diversas actividades, como: Cosecha, empaque, pulverización, desmalezado y riego.

Otras formas frecuentes de exposición, no ligadas directamente al trabajo de aplicación, son la ingestión accidental de plaguicidas en adultos o niños (por confusión con alimentos o bebidas), las exposiciones ambientales repetidas y moderadas (a través de contacto con aire o agua contaminada en áreas agrícolas) y las exposiciones a través de alimentos o agua potable contaminados(37).

Los agentes organofosforados actúan al inhibir la acción de la acetilcolinesterasa sobre la sinapsis hística (muscarínicas y nicotínicas), por depósito de un grupo fosforil en el centro de actividad de la enzima. Esta inhibición favorece la acumulación excesiva de ACh y por ende, la sobre estimulación de los receptores colinérgicos. En la sinapsis colinérgica, la acetilcolinesterasa fijada a la membrana postsináptica actúa como un interruptor que regula la transmisión colinérgica. Los agentes organofosforados inhiben las enzimas esterasas, principalmente la Acetilcolinesterasa de las sinapsis y membrana de los glóbulos rojos y la butirilcolinesterasa plasmática. La inhibición de la butirilcolinesterasa no parece provocar manifestaciones clínicas, sin embargo la inhibición de la acetilcolinesterasa provoca acumulación de ACh, con la consecuente sobre estimulación de los receptores de ACh en las sinapsis del Sistema Nervioso Autónomo, Sistema Nervioso Central y uniones neuromusculares(38).

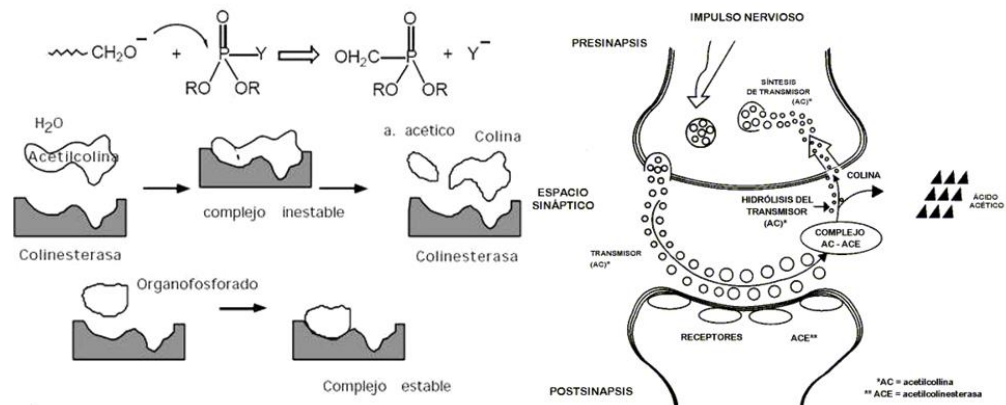


Figura 2 Mecanismo de acción de pesticidas organofosforados(38).

1.4. ORGANOFOSFORADOS.

Los organofosforados (OP) son una clase de insecticidas, varios de los cuales son altamente tóxicos. Hasta el siglo XXI, estaban entre los insecticidas más utilizados, treinta y seis de ellos están actualmente registrados para su uso en los Estados Unidos, y todos pueden causar toxicidad aguda y subaguda. Los organofosforados se utilizan en la agricultura, los hogares, los jardines y las prácticas veterinarias; sin embargo, en el último decenio, se han prohibido varios OP importantes, entre ellos el paratión, que ya no está registrado para ningún uso, y

el clorpirifos, que ya no está registrado para uso doméstico. Todos comparten un mecanismo común de la inhibición de la colinesterasa y pueden causar síntomas similares, aunque hay algunas diferencias dentro de la clase. Dado que comparten este mecanismo, la exposición al mismo organofosforado por múltiples vías o múltiples organofosforados, por múltiples vías puede dar lugar a graves toxicidades aditivas. Sin embargo, es importante comprender que existe una amplia gama de toxicidad en estos agentes y una amplia variación en la absorción dérmica, lo que hace muy importante la identificación específica del agente y la administración individualizada.(39)

a). Estructura

Las OP son ésteres del ácido fosfórico y sus derivados. La estructura química general de un organofosforado (figura 4) comprende un átomo de fósforo central (P) y el enlace fosfórico (P = O) o tiofosfórico (P = S) característico. El símbolo X representa el grupo saliente, que se sustituye (por sustitución nucleófila) por el oxígeno de la serina en el sitio activo AcHE. La tasa de inhibición de la AcHE depende del grupo que sale; mayor tendencia a dejar resultados en mayor afinidad del inhibidor a la enzima.

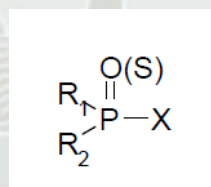


Figura 3. Estructura general de los organofosforados. X representa el grupo saliente, R1 y R 2 es el grupo lateral, normalmente alcoxi. (43)

b). Mecanismo de acción.

Los organofosforados son plaguicidas junto a los carbamatos son inhibidores de la enzima colinesterasa. Son ésteres del ácido fosfórico que se caracterizan por ser fácilmente hidrolizables ya sea en medio húmedo o pH alcalino. Se absorben por todas las vías pero principalmente los problemas de intoxicación son por las vía oral y dérmica. Su principal acción es sobre la acetilcolinesterasa y la colinesterasa plasmática. Producen una unión irreversible por fosforilación enzimática, dando como resultado la inhibición de acetilcolinesterasa(40, 41).

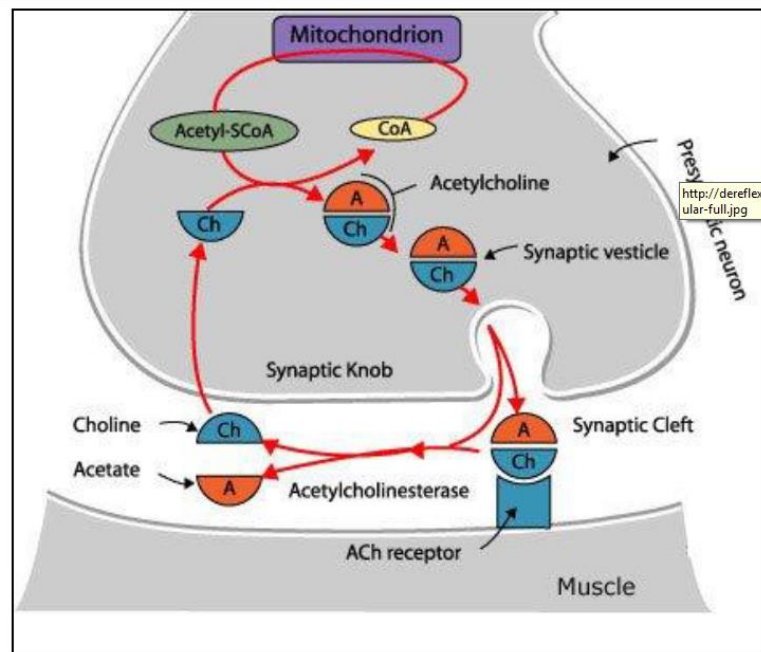


Figura 4 Esquema de inhibición de la acetilcolinesterasa (38)

Se sabe que existen dos tipos de receptores para este neurotransmisor: El receptor muscarínico, y el receptor nicotínico. Inmediatamente, tras ser liberada del receptor, la acetilcolina es hidrolizada por la colinesterasa. Los organofosforados reaccionan con la zona esterásica de la colinesterasa formando una unión irreversible. La acetilcolina se acumula entonces en la hendidura sináptica, desencadenando múltiples signos y síntomas.

Cuando se acumulan altos niveles de acetilcolina en las uniones colinérgicas nerviosas con el músculo liso y las células glandulares puede causar contracción del músculo y secreción, respectivamente. En las uniones músculo esqueléticas, puede causar espasmos musculares. Altas concentraciones de acetilcolina en el SNC causan alteraciones sensoriales y del comportamiento, incoordinación, depresión de la función motora y depresión respiratoria(40, 41).

1.4.1. Profenofos.

Nombre químico: (O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate).

Es un insecticida organofosforado de amplio espectro, no sistémico y foliar que fue desarrollado para controlar amplia gama de plagas de insectos que eran resistentes a clorpirifos y otros pesticidas.(42) Una razón para el uso extensivo de profenofos es su definición engañosa de su corta vida media en el suelo, sin embargo, se ha reconocido como plaguicida altamente persistente y tóxico incluso a bajas concentraciones.

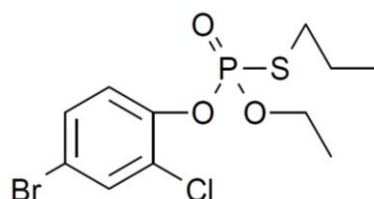


Figura 5 Estructura molecular de profenofos.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), este compuesto ha sido clasificado como un pesticida moderadamente peligroso (clase II Toxicidad). (43) Inhibe la enzima acetilcolinesterasa.(44)

1.5. *Trichoderma* sp.

El género *Trichoderma* comprende un gran número de cepas de hongos filamentosos, que se encuentran en una gran variedad de ecosistemas, estos hongos son en su mayoría aislados de bosques o de suelos agrícolas en todas las latitudes y pueden ser fácilmente cultivados in vitro. Presentan una esporulación verde típico y algunas especies producen un olor característico dulce o "coco", debido a un compuesto volátil biológicamente activo (6-pentil- α -pirona), tiene también una naturaleza micoparasítica (la capacidad de atacar a otros hongos y así aprovechar sus nutrientes) que es un potencial como agente de control biológico de hongos patógenos. (45)

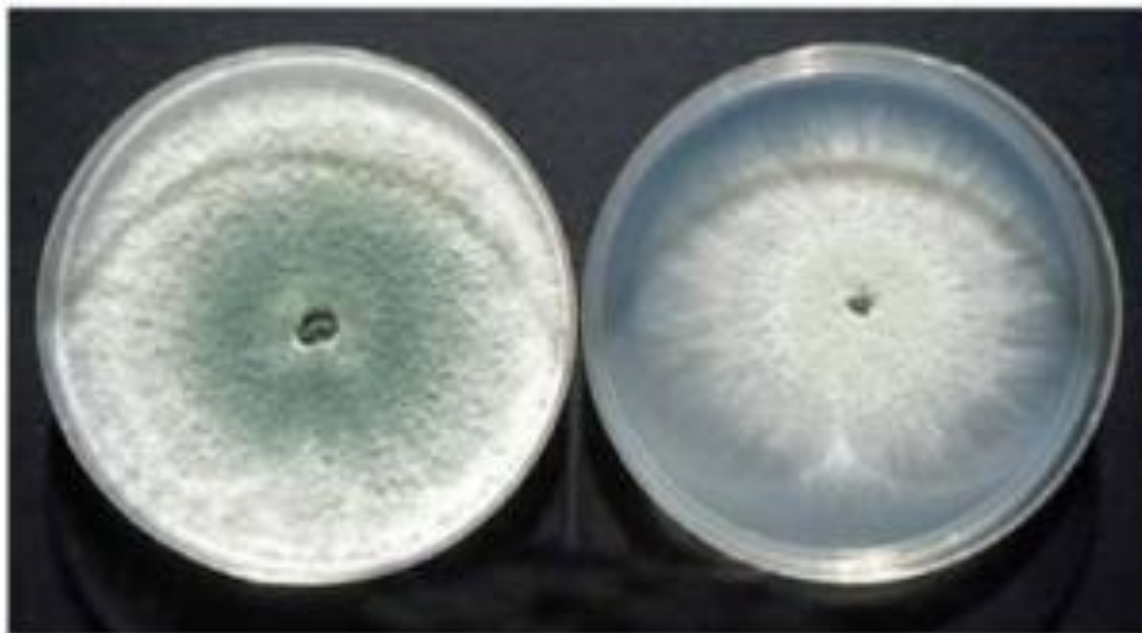


Figura 6 Colonia *Trichoderma harzianum*, (46)

1.5.1. Taxonomía

División 1 MYXOMICOTINA

Subdivisión 4 DEUTEROMYCOTINA

Clase 2 HYPHOMICETES

Orden Hyphales

Familia Monilaceae

Género *Trichoderma*

Especie *T. harzianum*

1.5.2. Descripción del género

A. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Identificación microscópica según Gams son:

a) Fialides.- Generalmente dispuestos en forma de verticilos, en pares alternadamente o en disposiciones irregulares. El cuerpo de las fialides es una característica de algunas divisiones, así en la división *Pachybasium* las fialides son generalmente pequeños y verticales, en tanto que en la división *Longibrachiatum* son alargadas en forma de cilindro, en la mayoría de las cepas las partes terminales de las fialides tienden a ser alargadas y estrechas.

b) Hifas.- Estas son anchas y rectas o relativamente angostas y flexibles. La punta de los conidióforos en especies de la división *Pachybasium* termina en una elongación la cual podría ser recta ondulada y espiralada.

c) Conidias.- Hay varias formas de conidias desde globosas, elipsoides, ovoidales y de pequeños cilindros, la parte final en forma estrecha basal y truncada. En general las diferencias en las dimensiones de las conidias en *Trichoderma* no son grandes; sin embargo, las especies que son parecidas pueden ser usualmente diferenciadas en tamaño. La superficie de las conidias aparece planas en la mayoría de las especies en observaciones a través de la luz del microscopio, aunque algunas especies tienen conidias aparentemente lisas y con estructuras adicionales. En algunos grupos de *Trichoderma viride* las conidias suelen ser ásperas y rugosas, y las conidias pueden tener proyecciones laterales en forma de balas al exterior, en dos especies *T. saturnisporum* y *T. ghanense* los pigmentos de las conidias también son características que varían de color desde cuerpos verdes, plomo o café pero estos colores no son frecuentes; en algunas especies maduras las conidias suelen ser de color verde oscuro y otras suelen ser más pálidas.

d) Clamidosporas.- Son muy comunes en las especies de *Trichoderma* pero estas tienden a ser en forma de globo o elipse, terminal o intercalada, con olores a moho o humedad, de color amarillento o verdoso y de 6-15 μm de diámetro en la mayoría de especies. (45)

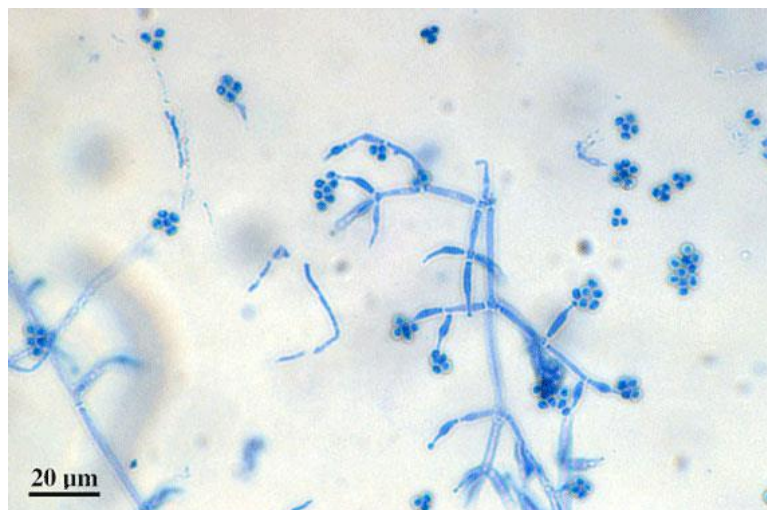


Figura 7 Conidios y conidióforos de *Trichoderma harzianum* (20um) (46)

B. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Trichoderma harzianum posee colonias de rápido crecimiento en PDA, 7-9 cm diámetro después de 3 días, micelio aéreo flucoso, blanco a ligeramente gris o raramente amarillo, conidiación que cubre con frecuencia toda la superficie de la placa que produce pústulas aplanadas hasta de 8mm en diámetro, concéntricas cerca de las márgenes de la placa, polvorienta granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril. Al reverso colonias incoloras o amarillas, pardas, ocráceas o en algunos aislados ferruginosas.

Pocos aislados producen abundantes cristales amarillos. Exudados incoloros a ámbar o amarillo verdoso.(47)

Pigmentaciones amarillo grisáceas son comunes en algunas especies, pero no son muy distintivas, al contrario algunas especies son mejor caracterizadas por una completa ausencia de pigmentación, mientras que algunos aislamientos muestran pigmentaciones rojizas. Características como cristales en el medio son producidas únicamente por *Trichoderma aureoviride*, indistintamente olores de mohos o humedad son producidos por diferentes cepas de *Trichoderma*, características de olores aromáticos parecidos a coco son producidos

comúnmente por algunas cepas de *Trichoderma viride* y a veces por *Trichoderma auroviride*(46)

1.6. BIODEGRADACIÓN

De acuerdo con la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, la biodegradación es la "descomposición de una sustancia catalizada por enzimas in vitro o in vivo". (48)

Esto puede ser caracterizado para el propósito de la evaluación de peligros tales como:

1. Primario. La alteración de la estructura química de una sustancia que resulta en pérdida de unas propiedades específicas de esa sustancia.
2. Ambientalmente aceptable. La biodegradación se da de tal manera como para eliminar propiedades indeseables del compuesto. A menudo, esto corresponde a la biodegradación primaria pero depende de las circunstancias en las que los productos se encuentren en el ambiente.
3. Último. Ruptura completa de un compuesto, oxidado completamente o reducido a moléculas simples (tales como dióxido de carbono / metano, nitrato / amonio y agua). Cabe señalar que los productos de la biodegradación pueden ser más perjudiciales que la sustancia degradada.

La degradación microbiana de compuestos químicos en el medio ambiente es una ruta importante para la eliminación de estos compuestos. La biodegradación de estos compuestos, es decir, los pesticidas, es a menudo compleja e implica una serie de reacciones bioquímicas. Aunque muchas enzimas pueden catalizar eficazmente los pesticidas, la plena comprensión de la vía biodegradación menudo requiere nuevas investigaciones. Varios estudios de biodegradación de pesticidas han demostrado sólo el total de pesticida degradado, pero no han investigado en profundidad los nuevos productos biotransformados y su destino en el medio ambiente. (48)

Actualmente, entre los diversos grupos de plaguicidas que se utilizan en todo el mundo, plaguicidas organofosforados forman el grupo mayor y más ampliamente utilizado que da

cuenta de más del 36% del total del mercado mundial. El más utilizado entre ellas es el metil paratión. Su acumulación tiene muchos riesgos para la salud asociados a la misma, por lo tanto, su degradación es muy importante. (49).

Los plaguicidas organofosforados (OP) son todos los ésteres de ácido fosfórico y también se llaman organofosfatos, que incluyen alifático, fenilo y derivados heterocíclicos, debido a la utilización a gran escala de compuestos OP, contaminaciones de los sistemas de suelo y agua se tienen en todas partes del mundo. A la luz de esto, la biorremediación proporciona una adecuada manera de eliminar los contaminantes del medio ambiente como en la mayoría de los casos, los compuestos OP son totalmente mineralizados por los microorganismos. La mayoría de los compuestos OP se degradan por microorganismos en el medio ambiente como fuente de fósforo y / o de carbono.

Por lo tanto, los plaguicidas organofosforados pueden ser hidrolizados y desintoxicados por enzimas como la carboxilesterasa y fosfotriesterasas.

Los organofosforados se utilizan para controlar una variedad de insectos, chupadores picadores, arañuelas, pulgones, y plagas que atacan a los cultivos como el algodón, la caña de azúcar, maní, tabaco, verduras, frutas y plantas ornamentales. Los plaguicidas organofosforados son comercializados por muchas partes del mundo de principales compañías de agroquímicos. Algunos de los principales productos agrícolas son el paratión, metil paratión, clorpirifos, malatión, monocrotofos, diazinón, y fenitrotión dimetoato.

Los organofosforados poseen una actividad insecticida eficaz, debido a su característica de inhibir irreversiblemente la enzima acetilcolinesterasa en el sistema nervioso, que actúa tanto en insectos como en mamíferos. En el hombre, los organofosfatos se absorben a través de todas las rutas, alcanzando altas concentraciones en los tejidos grasos, el hígado, los riñones, las glándulas salivales, tiroides, páncreas, los pulmones, el estómago, los intestinos, en menor proporción en el sistema nervioso central (SNC) y los músculos. Sin embargo, los organofosfatos no se acumulan en el organismo humano, ya que es fácilmente biotransformable en el hígado. La excreción de estos compuestos y de sus metabolitos es bastante rápido, teniendo lugar principalmente en la orina en pequeñas proporciones, en las

heces, por lo general dentro de las 48 h. Los niveles de excreción más grandes se producen dentro de 24 h después de la absorción. (50)

Debido a los riesgos de salud anteriormente mencionados y otros problemas asociados con el uso plaguicidas organofosforados, la detección temprana y la posterior descontaminación y desintoxicación del medio ambiente contaminado es esencial. (51)



CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO INVESTIGACIÓN.

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de investigación de la Maestría en Química del Medio Ambiente de la Universidad Católica de Santa María (UCSM).

2.2. UNIDADES DE ESTUDIO.

En este trabajo se utilizó el hongo *Trichoderma sp*, obtenido del aislamiento de suelo agrícola de la zona de Zamacola del Distrito de Cerro Colorado – Arequipa, este hongo es un microorganismo presente en suelo, agua, plantas para la biodegradación de profenofos.

2.3. EQUIPOS.

- **Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución** con arreglo de diodos (HPLC-DAD) Hitachi Primaide, con arreglo de diodos, columna de separación Hypersil GOLD™ Silica de dimensiones 5 μ m*20mm+250mm, bomba Primaide 1110, inyector automático 1210, detector UV y matriz de diodos 1430 con lámpara de deuterio (D₂).
- **Baño ultrasonido** BRANSON 2510R-DTH Ultrasonic Cleaner con (temporizador digital, calor y gas), Tanque: 6 "x 5.5" x 4 ", capacidad: 1/2 galón, frecuencia: 40 kHz, peso: 10 libras.
- **Centrifuga de laboratorio** EBA – 20 con rotor fijo de 8 puntos, tubos de hasta 15 ml de volumen, con una velocidad máxima de 6.000 rpm / 3.461 RCF y un tiempo de funcionamiento 1 - 99 min / continuo, pulsador.
- **Estufa** Memmert modelo SM 200 con regulación de temperatura de +30 - 200 C°, control de aire por recirculación natural y timer de 0 - 120 min.

- **Unidad de purificación de agua ultra-pura** Simplicity® system, resistividad a 25 °C de 18,2 MΩ•cm, partículas (tamaño > 0,22 μm) de < 1 partícula/ml, caudal de 0.5 L/min.
- **Balanza digital.** OHAUS Pioneer de precisión de 210g – 0.001 g

2.4. MATERIALES.

- Pipetas.
- Pipeta pasteur.
- Jeringas.
- Micropipetas.
- Beaker.
- Matraces
- Tubos ensayo.
- Probetas.
- Envases de vidrio.
- Cuaderno de Tesis.
- Termómetro digital



2.5. REACTIVOS.

Estandar de Profenofos (99.99%) de Sigma Aldrich, Acetonitrilo grado HPLC de Merck, Hexano grado analítico de Merck, Acetato de Etilo grado analítico de Merck, Sulfato de sodio anhidro Na_2SO_4 de Merck, Cloruro de sodio NaCl de Merck, Dextrosa de Sigma Aldrich, Nitrato de Amonio NH_4NO_3 , Fosfato ácido de potasio K_2HPO_4 , Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Cloruro de potasio KCl , Cloranfenicol, también se usaron pesticidas comerciales como el Profenofos (SELECRON) de 500g/L de Syngenta, Pentacloro (pentaclorofenol) de Farmex,

2.6. METODOLOGÍA

La metodología del presente trabajo constó de 11 etapas a realizar tal y como se muestra en la **Figura 8**. Para el diseño experimental se tomó en cuenta tres variables que fueron: Temperatura, pesticida, concentración inóculo. Una vez desarrollada la matriz correspondiente se procedió a realizar los ensayos de biodegradación.

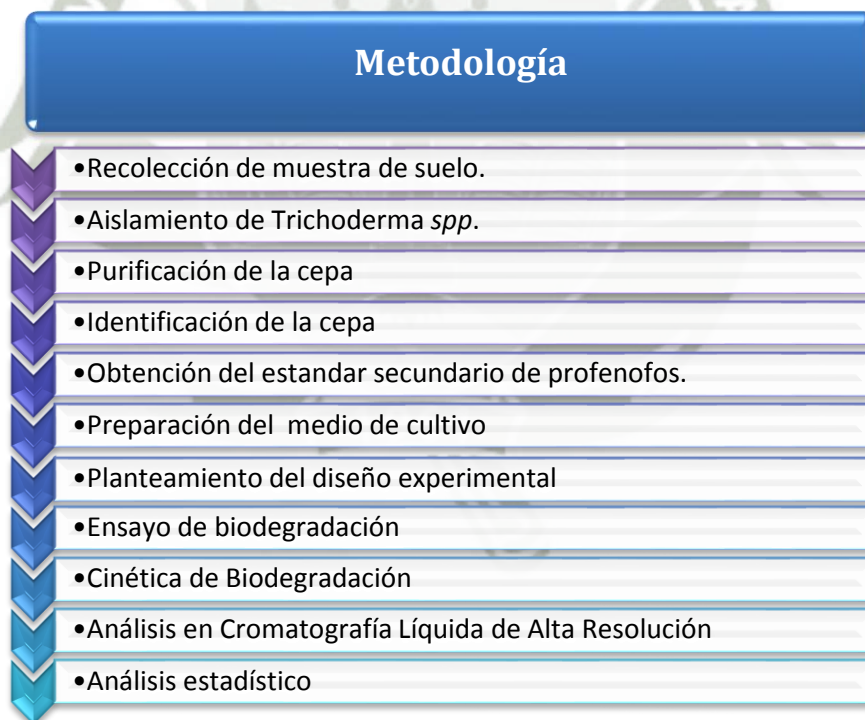


Figura 8 Flujograma de la metodología de trabajo.

2.6.1. Recolección de muestra

La toma de muestra fue realizada de acuerdo a lo descrito por Brady y colaboradores, se tomaron 2 muestras de suelo M1 y M2 cada una se subdividió en 10 sub-muestras de la zona de Zamácola (Cerro Colorado - Arequipa, 2016). Las sub-muestras fueron recogidas en zigzag, a una profundidad de 0- 30cm y un peso aproximado de 100 – 200 gramos, se mezclaron, y de esta se volvió a sacar una sub-muestra de 200 gramos la cual se almacenó en bolsas de plástico para su posterior uso. (34)

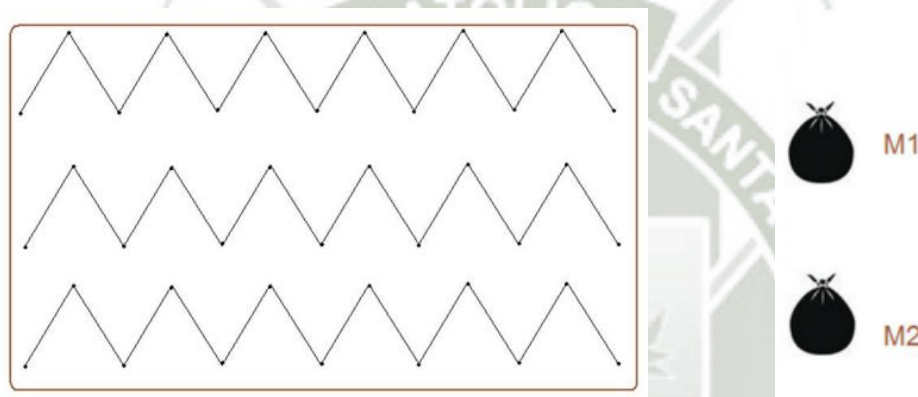


Figura 9 Esquema de la forma de muestreo en campo. (Fuente propia)

2.6.2. Aislamiento de *Trichoderma* sp.

En el laboratorio, los aislamientos de la cepa fúngica fueron realizados directamente por método de dilución en placas petri en medio cultivo sólido. El suelo fue diluido 1/1000 (p/v) y una alícuota 0.1 ml de la suspensión se dispersó uniformemente por toda la superficie de la placa Petri con el medio de cultivo para *Trichoderma*, TSM;)(52)

La composición del medio TSM fue la siguiente:

- Nitrato de Amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) 1,00 g
- Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4) 0,90 g

- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,20 g
- Cloruro de potasio (KCl) 0,15 g
- Cloranfenicol 0,25 g
- Glucosa 3,00 g
- Agar 20,00 g
- Agua 1,00 L

Para preparar la solución fungistática se agregó 0,2 g de pentaclorofenol en 1 L de agua destilada estéril. No se esterilizó ya que éste es un fungicida termolábil. Para otras prácticas de manejo del hongo, como multiplicación de conidios, se utilizó el Agar Papa Glucosado al 2% con cloranfenicol 500 mg/L. (APG)(52).

2.6.3. Purificación de la cepa.

Una vez obtenida la cepa de *Trichoderma sp*, después del aislamiento de este en medio de cultivo TSM, se procedió a su purificación mediante la técnica de resiembra sucesiva en el medio de cultivo PDA. Esta técnica fue utilizada hasta que se logró purificar la cepa, realizándose en total 10 repiques.

2.6.4. Identificación de la cepa

Se tomaron muestras de colonia del total de cajas petri, las mismas que se pasaron individualmente a placas para observar su crecimiento. De acuerdo a las características como: forma del micelio, color del micelio, tipo de micelio, esporulación, color que adquiere el medio de cultivo y el olor que emite, se escogieron 3 cepas rotulándose de A1 ; A3 además se observó al microscopio lente 40 X y 100X, las muestras poseían fiálides que son estructuras morfológicas únicas del género *Trichoderma sp*(53).

a) Morfológica.

La cepa será separada de acuerdo a la morfología de los conidios, coloración y velocidad de crecimiento. Para la identificación macroscópica se realizara tomando en cuenta el aspecto de la colonia fúngica, considerando el color, tipo de micelio, cambio de color en el medio de cultivo y aroma.

La identificación microscópica será en base a las características del género como son conidióforos hialinos ramificaciones, no verticilado, fialides individuales y en grupo, conidios hialinos en una célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales, se usaran las claves de identificación(53, 54).

b) Molecular.

Para la identificación molecular de los hongos se recurrió a un servicio de extracción y purificación de ADN por parte de la empresa ADN Uchumayo, (Peru), para la secuenciación se llevó a cabo en el laboratorio Functional Biosciences (EE.UU.) para lo cual se enviaron los productos de la amplificación por PCR y los primers usados. Se usó la secuencia del gen ITS1F cuya metodología fue la siguiente:

Para la extracción del ADN se usó el kit MasterPure DNA Purification Kit de Epicentre con la siguiente modificación que en resumen es como sigue: con un asa se tomó una azada de micelio (0.5-0.75 g) crecido previamente en una placa petri con medio de cultivo y fueron colocadas en un mortero. Se añadió aproximadamente 50 mL de Nitrógeno líquido y se dejó evaporar por unos minutos una vez evaporado el nitrógeno líquido, se añadió nuevamente otros 50 mL de nitrógeno líquido y se trituró hasta obtener un polvo fino. El hongo pulverizado fue re- suspendido en 200 uL de buffer de lisis conteniendo proteínas K, luego a baño maría por 15 minutos a 65 °C, después se agregó 150 uL de MPC, y se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad. Se recuperó el sobrenadante y se añade 500 uL de isopropanol para precipitar el ADN, se realizó un lavado

con Etanol al 70%; después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet que contiene el ADN fue re - suspendido con 50 uL de agua destilada estéril.

Para la amplificación del gen ITS1 se añadió 2 µL de ADN de cada muestra, 2 µL de la solución de primers 100 nM (Forward 'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y Reverse 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), y 45 µl de Platinum Blue PCR Supermix. Los tubos, se colocaron en un termociclador Bio Rad (MyCycler™ Thermal Cycler System With Gradient Option) a 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 58 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos.

El producto de la PCR fue purificado utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit. Donde se utilizó columnas de QIAGEN y se siguió las instrucciones de la compañía. El fragmento purificado fue secuenciado con el primer ITS1F.

c) **Filogenia Molecular (Secuenciación del ADN).**

Las secuencias del gen de ADN 16S de las cepas nativas, que fueron obtenidas por secuenciación, fueron analizadas individualmente y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo BLAST (blast) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), y luego se construyó arboles filogenéticos para determinar las distancias genéticas, porcentaje de similitud con otras especies.

2.6.5. Preparación del estándar secundario de Profenofos

Se hizo necesario preparar un estándar secundario de profenofos a partir de profenofos comercial esto debido a que no se contaba con la suficiente cantidad de estándar primario profenofos y por lo consiguiente no iba alcanzar para la investigación.

El estándar secundario se obtuvo a partir de un pesticida comercial SELECRON (profenofos), siguiendo la técnica de extracción descrita por Bumpus, la misma metodología también se aplicó para las unidades experimentales. (55)

Se tomaron 2 mL del pesticida comercial a una concentración conocida, este se homogenizó en un tubo de ensayo con 2 mL de la mezcla de acetato de etilo y hexano (1:1), se adicionaron 0.2 g de cloruro de sodio, esta mezcla fue sometida a baño ultrasonido por 5 min y posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos, de la separación de fases se extrajo el pesticida con la fase orgánica, el mismo procedimiento se repitió 2 veces, para así asegurarnos de extraer el total del pesticida, pasado esto se procedió a eliminar el agua que pudiese estar presente con 0.2 g de sulfato de sodio anhidro, y se evaporó y reconstituyó con acetonitrilo en volúmenes conocidos (fiolas de 2 ml).

El mismo procedimiento fue tomado para la extracción de pesticidas de las unidades experimentales del trabajo de investigación.

2.6.6. Preparación del medio de cultivo.

Se preparó medio de cultivo líquido, constituido por: Extracto de papa, Dextrosa y Agua destilada a razón de 200 y 20 g/L respectivamente, para los ensayos del trabajo de investigación.

La dextrosa, extracto de papa y el agua se mezclaron a un volumen de 1 litro, esto se llevó a ebullición, y fue auto clavado a 121°C, 15 psi de presión durante 15 minutos, en envases de vidrio de capacidad de 40 ml, con 25 ml de medio en cada uno.

2.6.7. Unidades experimentales.

Los ensayos de biodegradación fueron desarrollados en medio de cultivo líquido (papa, dextrosa y agua) 25 ml, contenidos en envases de vidrio, en cada unidad experimental se inoculó conidios de *Trichoderma sp*, estos se dejaron desarrollar durante 3 días, después de este tiempo el pesticida organofosforado

(profenofos) disuelto en acetonitrilo fue agregado a todas las unidades experimentales.

Se evaluaron 3 factores: pesticida, *Trichoderma sp* y temperatura, cada uno a dos niveles, pesticida a 10 y 30 mg/L, *Trichoderma sp* a 1E+4 y 1E+6 conidios y para la temperatura se tomó a 15 y 25 °C, se tomaron muestras al inicio y final del ensayo la duración del ensayo fue de 21 días.

2.6.8. Ensayo de biodegradación.

Utilizando la matriz obtenida a partir del diseño experimental (Tabla 1), se realizaron los ensayos de biodegradación; el sistema constó de 3 factores: pesticida, *Trichoderma sp* y temperatura, cada uno a dos niveles, pesticida a 10 y 30 mg/L, *Trichoderma sp* a 1E+4 y 1E+6 conidios y para la temperatura se tomó a 15 y 25 °C, se tomaron muestras al inicio y final del ensayo la duración del ensayo fue de 21 días.

Tabla 1 Diagrama experimental que se aplicó para desarrollo de la investigación.

Factores	Niveles		Unidades
Pesticida	10	30	mg/L
<i>Trichoderma sp</i>	1.00E+04	1.00E+06	N° de Conidios
Temperatura	15	25	°C

2.6.9. Ensayo de cinética de biodegradación.

Los ensayos de la cinética de biodegradación fueron desarrollados en medio de cultivo líquido (papa, dextrosa y agua) 50 ml, contenidos en envases de vidrio. En cada unidad experimental se inoculó conidios de *Trichoderma sp*, estos se dejaron desarrollar durante 3 días, pasado esto el pesticida organofosforado (profenofos) disuelto en acetonitrilo fue agregado a todas las unidades experimentales.

Se evaluaron 3 factores: pesticida, *Trichoderma sp* y temperatura, esto se realizó con los valores óptimos de biodegradación después de realizar el ensayo de biodegradación, la toma de muestras se realizó cada 2 días, durante un total de 21 días a la par con este ensayo también se evaluó la biodegradación de profenofos solo en un medio de cultivo (Testigo), para así observar su degradación natural, también se tomaron muestras para su cuantificación con la frecuencia ya descrita anteriormente(56, 57).

2.6.10. Análisis de profenofos por Cromatografía Líquida de Alta resolución.

El equipo usado fue el Equipo de HPLC marca HITACHI detector UV con arreglo de diodos.

Se utilizaron las muestras obtenidas a partir de la extracción líquido - líquido de cada uno de los ensayos en viales de 2ml. Para realizar las lecturas en el equipo de cromatografía de líquida de alta resolución se usó lo siguiente:

- Acetonitrilo
- Agua ultrapura
- Columna de separación Hypersil GOLD™ Silica Columns LC de dimensiones 5 μ m x 20mm x 250mm

Condiciones cromatográficas.

- Fase móvil: Acetonitrilo y Agua (70:30)
- Flujo: 2ml/min
- Volumen de inyección 20 μ L.
- Gradiente isocrática.
- Temperatura: 25°C \pm 5.

– Absorbancia: 210nm.

A continuación, se procedió a la determinación de la concentración de profenofos por cromatografía líquida de alta resolución con una metodología ya validada anteriormente por Gonzales.,(58) en el equipo HPLC-DAD del “laboratorio de investigación del proyecto mercurio”, donde se obtuvieron los siguientes parámetros de validación.

a). Linealidad

Según el método validado ya en laboratorio anteriormente evaluaron el parámetro de linealidad donde prepararon soluciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/L de profenofos a partir de estándares primarios Sigma Aldrich a las condiciones cromatográficas ya establecidas. Por otro lado el método presentó una correlación lineal entre la concentración versus respuesta, ya que observaron un coeficiente de correlación r^2 de 0.9994 para profenofos, este valor es mayor a 0.995 siendo este el valor mínimo para considerar a un método como lineal según la USP. (59)

b). Límites de detección y cuantificación

En el método validado por Gonzales obtuvo un límite de cuantificación (LC) de 0.1450 mg/L de profenofos y un límite de detección (LD) 0.0477 mg/L para profenofos.(58)

c). Precisión

En el método ya validado por Gonzales, se basaron en la norma USP para considerar el método preciso, esta norma considera que un método es preciso cuando el coeficiente de variación porcentual está por debajo de 2.7 %, obtuvieron un coeficiente de variación porcentual de 2.45 % para profenofos, estando este valor ubicado dentro del rango de aceptación por dicha norma, se le consideró como un método preciso (59, 60).

d). Exactitud

Obtuvieron porcentajes de recuperación de 79,38%. para profenofos interpretando el resultado como un método exacto ya que obtuvieron resultados dentro del rango establecido por la USP (porcentaje de recuperación > 70 %)(59, 60)

2.6.11. Análisis estadístico.

Diseño Experimental

El diseño estadístico de experimentos contempla una amplia variedad de modelos experimentales que son óptimos para generar la información que se busca. Por lo tanto, los diseños factoriales completos son la estrategia experimental óptima para estudiar simultáneamente el efecto de varios factores sobre la respuesta y sus interacciones(61).

Se inició fijando las variables según los objetivos propuestos; que permitan obtener la mejor respuesta del sistema (mayor porcentaje de biodegradación). Para determinar el tipo de diseño, se procedió a darles valores, como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Valores de las variables elegidas para la determinación del diseño factorial en el proceso de biodegradación de profenofos.

Tratamiento	Concentración pesticida (mg/L)	Concentración Inóculo (U)	Temperatura (°C)
M1	30	1.00E+04	15
M2	10	1.00E+04	15
M3	30	1.00E+04	25
M4	10	1.00E+04	25
M5	30	1.00E+06	15
M6	10	1.00E+06	15
M7	30	1.00E+06	25
M8	10	1.00E+06	25

En ésta se observó que todas las variables fueron numéricas, por lo tanto, se pudo utilizar el diseño factorial completo general.

Se determinó el número de ensayos utilizando el factorial 2^k para las variables (todas las combinaciones posibles), pero como se optó por trabajar con un diseño factorial donde se contemplaba todas las combinaciones posibles y cada una por triplicado. El número de ensayos fue 24 tal y como se muestra en la **Tabla 3**.

Para hacer el análisis de los resultados de manera estadística se planteó un diseño factorial completo, por triplicado. Para el tratamiento estadístico de los resultados se usó una estadística comparativa, empleando el programa *Statgraphics* para agilizar los cálculos estadísticos necesarios y graficar los resultados del análisis.

Se tomaron muestras cada 2 días durante 21 días y se determinaron las concentraciones de profenofos por HPLC bajo las condiciones de extracción y determinación ya establecidas.

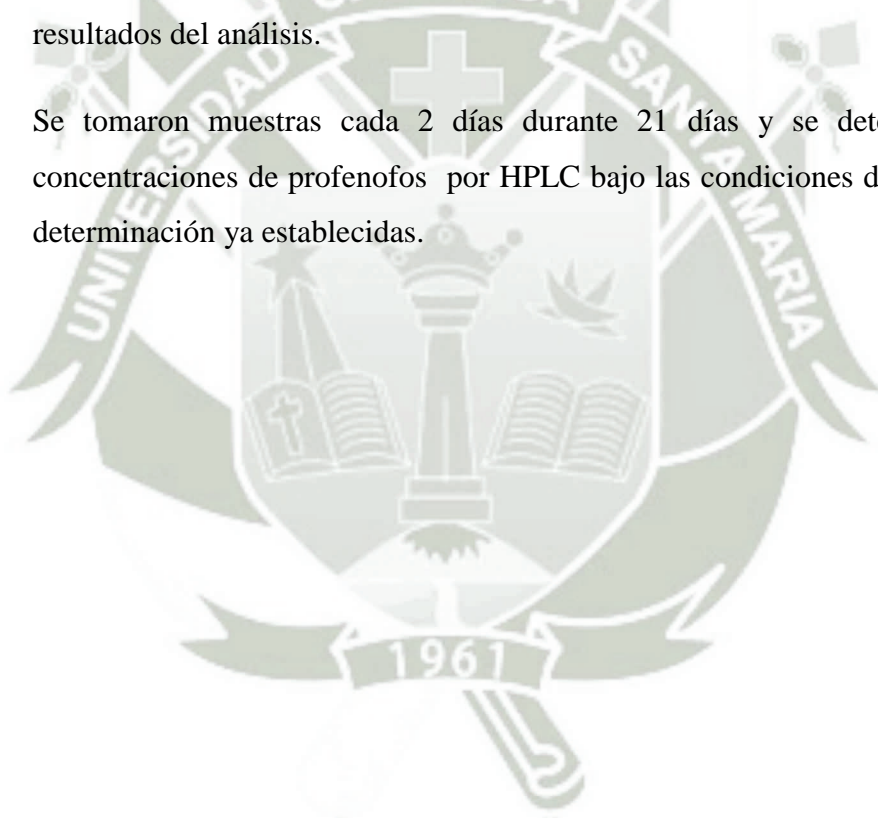


Tabla 3 Matriz de trabajo obtenida del diseño factorial multinivel, con todas las combinaciones posibles de los niveles de cada variable.

Código	Orden Corrida	Concentración Pesticida	Concentración Inóculo	Temperatura
A	1	10	1E+04	25
B	2	30	1E+04	15
C	3	10	1E+06	15
D	4	30	1E+04	25
E	5	30	1E+06	25
F	6	30	1E+06	25
G	7	30	1E+04	25
H	8	10	1E+06	25
I	9	30	1E+04	15
J	10	10	1E+06	15
K	11	10	1E+06	25
L	12	10	1E+06	25
M	13	10	1E+04	25
N	14	30	1E+06	25
O	15	30	1E+06	15
P	16	10	1E+04	15
Q	17	10	1E+06	15
R	18	30	1E+04	15
S	19	10	1E+04	15
T	20	30	1E+06	15
U	21	10	1E+04	15
V	22	30	1E+06	15
W	23	10	1E+04	25
X	24	30	1E+04	25

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. TOMA DE MUESTRAS.

La toma de muestra se realizó en la zona de Zamácola distrito de Cerro Colorado provincia de Arequipa, departamento de Arequipa, de un campo donde se cultivaba maíz forrajero, de la zona de muestreo de coordenadas Latitud $16^{\circ}22'03.58''S$. Longitud $71^{\circ}33'52.03''O$, se tomaron muestras de suelo el 25 noviembre del 2016.



Figura 10 Mapa satelital del lugar de muestreo (Tomado de Google Earth).

3.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La identificación morfológica del aislado potencial de *Trichoderma sp.*, se realizó utilizando una llave de identificación basada en la aparición y pigmentación de la colonia, la tasa de crecimiento a 23 ° C, la presencia y tamaños de conidios, los patrones de ramificación de los conidióforos y la presencia o ausencia de clamidosporas.

3.2.1. Características de la colonia

Se estudiaron las características del aislado de *Trichoderma sp.* en cultivos de PDA de 7 días de edad que se incubaron a 23 °C, el aislamiento del hongo creció bien y formó conidios a los 4 días. La producción de conidios de la cepa se difundió, dispersó y no hubo la formación de anillos concéntricos. El color de los conidios maduros era de color verde. La producción de conidios estaba restringido al centro de las colonias, difundidas y de color verde amarillento.

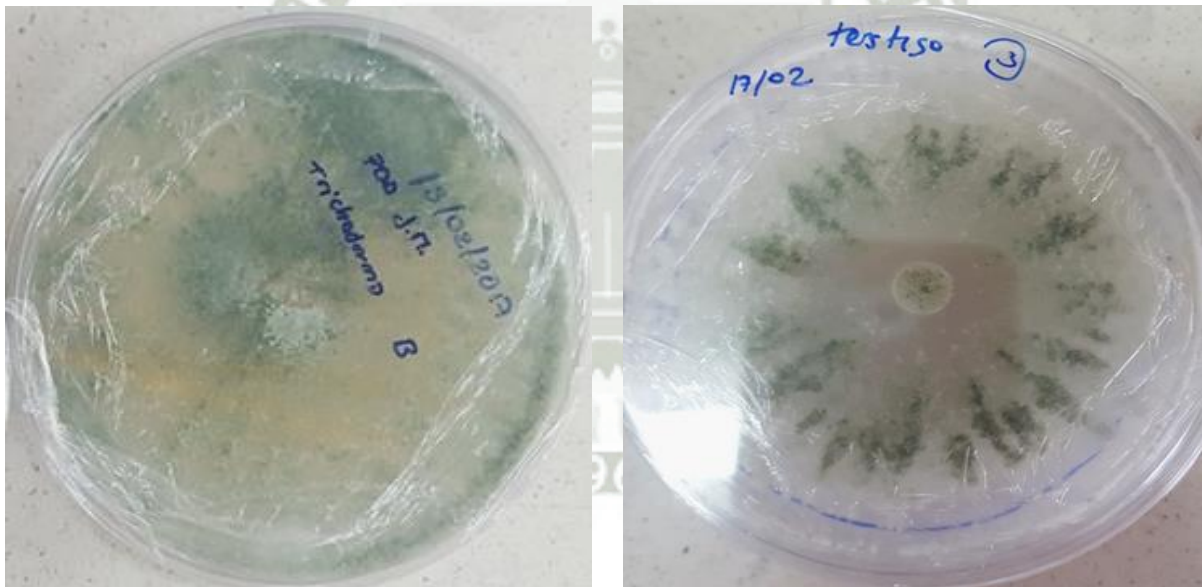


Figura 11 Cepa del hongo *Trichoderma sp.*

3.2.2. Características microscópicas

Las características microscópicas del aislado de *Trichoderma sp.* se observaron bajo microscopio óptico con un aumento de 100X. Bajo el microscopio óptico,

los colores de los conidios de la cepa se encontraron verdes. Para la cepa fúngica los conidios se presentaron de forma globosa. Los tamaños de conidios de este aislado fueron iguales. Los conidióforos se muestran con ramas primarias pareadas sus fialides son en forma de frasco y normalmente se sostiene en verticilos de dos a tres fialides. Todas las clamidosporas observadas eran unicelulares y parecían globosas a sub globosas. Al observar estas características y de acuerdo con la llave de identificación podríamos decir que esta cepa se trataría de *Trichoderma harzianum*.



Figura 12 Características microscópicas de *Trichoderma sp.*

3.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.

Para la identificación molecular de los hongos se recurrió a un servicio de extracción de ADN por parte de la empresa ADN Uchumayo, la secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio Funcional Biosciences (EE.UU.) para lo cual se enviaron el ADN extraído de la muestra, los productos de amplificación por PCR y los primers usados después de obtener las secuencias de ADNr de la cepa.

Secuencias alineadas:

```
>9-hongocutipa_ITS1F TRIM QUALITY: 20
CGGAGGGatcATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTA
CCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCG
GACCAAGGCGCCCCGCCGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCC
TCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGT
TTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTGC
GCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTG
GCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGG
GAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
```

Esta secuencia fue analizada utilizando el software “BLAST” (Basic Local Alignment Search tool), de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) la cual buscó similitud de las secuencias obtenidas con las secuencias que se tiene en el banco de genes “GENBANK”, este arrojó como resultado una lista de organismos que tienen un elevado porcentaje de homología con la muestra que se está analizando.

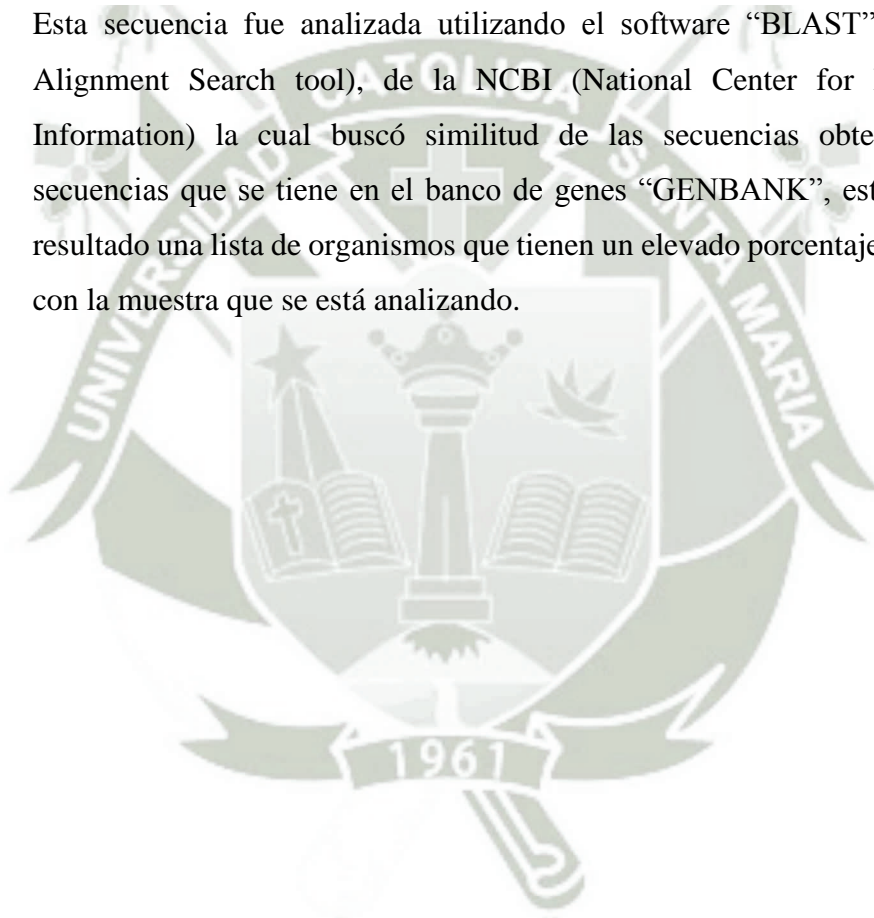


Tabla 4 Reporte taxonómico al que pertenece la secuencia procedente del aislado de *Trichoderma sp.*, y las similitudes de este con otras secuencias, procesadas por el programa BLAST.

N°	Descripción	Cobertura de consulta	Identidad	Código
1	Trichoderma harzianum isolate T50 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28 ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%	KX34087.1
2	Trichoderma harzianum strain N13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	100%	100%	KX967317.1
3	Trichoderma harzianum strain QT 22124 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28 ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%	KX225665.1
4	Trichoderma harzianum strain QT 22098 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28 ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%	KY225652.1
5	Trichoderma harzianum strain TW 1990 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28 ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%	KY209922.1
6	Trichoderma sp. isolate XI42 internal transcribed spacer 1, partial sequence 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	100%	KX008671.1

Los análisis de las secuencias de ADN para la identificación molecular de las especies de *Trichoderma sp.* mostraron porcentajes altos de identidad con varias muestras de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma sp.*, viendose similitudes del 100 % (**Tabla 4**).

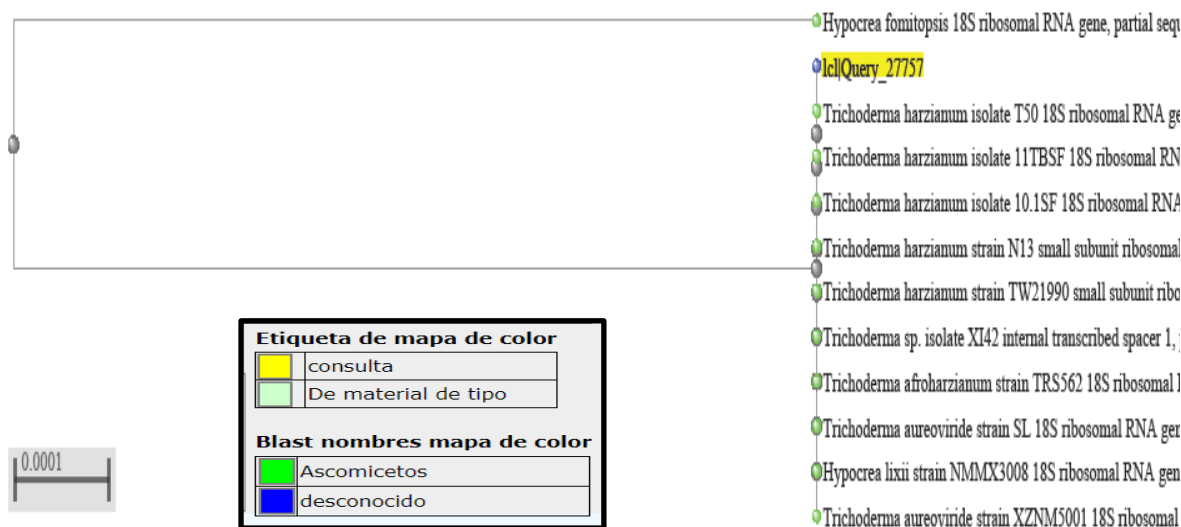


Figura 13 Relación filogenética del aislamiento de *Trichoderma* inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1). La filogenia fue inferida por el programa BLAST la barra de escala 0.001 sustituciones por sitio.

3.4. INSCRIPCIÓN DE LA CEPA A GENBANK.

También se procedió registrar la cepa de hongo en la base de datos de Genbank, con código de acceso (**9.sqn 9-hongocutipa_ITS1F MF498831**) ver en ANEXO 1.

3.5. DETECCIÓN DE LA CEPA FÚNGICA.

La cepa de hongo estudiada fue *Trichoderma spp*, se trata de microorganismos multicelulares, que crecen como micelios, compuestos por filamentos microscópicos ramificados llamados hifas. Los hongos se cultivaron en medio sólidos y líquidos a pH 6, que es un buen pH para el cultivo de la mayoría de los hongos, mientras que el óptimo puede variar de 4 a 8. Estos valores de pH favorecen el crecimiento de hongos e inhiben el crecimiento de la mayoría de las bacterias, cuya condición óptima de cultivo es a pH más alto (62). El microorganismo se cultivó en placas de Petri que contenían papa dextrosa y agar (PDA)

3.6. TOLERANCIA DE PROFENOFOS PARA *Trichoderma sp.*

La cepa investigada se analizó en presencia y ausencia del plaguicida profenofos, en ensayos triplicados, comparando el crecimiento de las colonias en placas Petri en varias concentraciones del pesticida y en su ausencia (control). Las cantidades añadidas a los cultivos sólidos fueron de 10, 30, 50 y 100 μ l por placa de Petri, correspondientes a concentraciones de 10, 30, 50 y 100mg/L de profenofos respectivamente.



Figura 14 Ensayo de tolerancia para el hongo *Trichoderma sp.*

Se analizó el aislamiento del hongo para determinar su capacidad para crecer y tolerar profenofos en concentraciones que oscilan entre 10 y 100 mg / L en placas con medio de cultivo sólido PDA. Los resultados mostraron que el hongo aislado mostró diferentes grados de sensibilidad hacia el pesticida profenofos. Debido al efecto tóxico del profenofos, la tasa de crecimiento micelial registrada para todos los tratamientos se redujo en gran medida en presencia de profenofos y se redujo aún más con el aumento de las concentraciones de profenofos. El aislamiento fúngico fue capaz de crecer en presencia de 100 mg / L de profenofos.

El hongo mostró crecimiento en todas las concentraciones probadas (10, 30, 50 y 100 mg/L), los diámetros de crecimiento de micelio fue mínimo en la concentración a 100 mg/L.

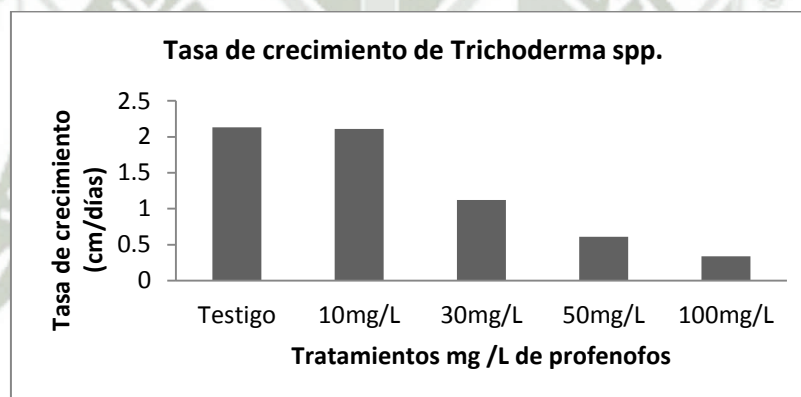


Figura 15 Tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma sp.*

Se seleccionó la placa con la cepa fúngica que estuvo sometida a 30 mg/L de profenofos, debido a que esta tuvo un porcentaje de inhibición en su crecimiento micelial menor a 50%, la tasa de crecimiento micelial fue de 1.12 cm/día (**Figura 13**) al no tener una alta inhibición de su crecimiento (47.06%) debiera mostrar la mejor tasa de degradación frente a profenofos.

Tabla 5 Crecimiento de micelio de *Trichoderma sp* frente a diferentes concentraciones de profenofos en medio sólido (PDA)

Diámetros de Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> En medio sólido (PDA)									
Diámetro de colonia (cm)									
Hongo	Testigo (sin profenofos)	Tratamientos (con profenofos)							
		A	10 mg/L	% inhibición n	30 mg/L	% inhibición n	50 mg/L	% inhibición n	100 mg/L
<i>Trichoderma sp.</i>	8.50	8.50	0.00%	4.70	44.71%	2.50	70.59%	1.40	83.53%
<i>Trichoderma sp.</i>	8.50	8.50	0.00%	4.50	47.06%	2.40	71.76%	1.30	84.71%
<i>Trichoderma sp.</i>	8.50	8.50	0.00%	4.30	49.41%	2.60	69.41%	1.40	83.53%
Promedio	8.50	8.50	0.00%	4.50	47.06%	2.50	70.59%	1.37	83.92%
ST	0.00	0.00	0.00	0.20	0.02	0.10	0.01	0.06	0.01
CV (%)	0.00%	0.00%	0.00	4.44%	5.00%	4.00%	1.67%	4.22%	0.81%

Para las concentraciones de profenofos más altas 50 y 100 mg/L, las inhibiciones fueron mayores a 50%, la cepa fúngica siguió mostrando un crecimiento micelial, para determinar la viabilidad de la cepa fúngica sometida a las diferentes concentraciones de profenofos, se realizó un repique de estas placas en medio de cultivo sólido PDA libre de pesticida, se observó que no variaba en su desarrollo y mostró también que la cantidad de conidios (UFC) que produjo eran iguales (no había diferencia significativa en cuanto a su totalidad por mililitro de medio). Para los tratamientos de 10, 30,50 y 100 mg/L mostraron 1.1E+8, 1.08E+8, 1.11E+8 y 1.1E8 conidios/ml respectivamente.

Según Lamar y colaboradores tener un microorganismo que sea capaz de tolerar altas concentraciones de contaminantes sería una clara ventaja para la biorremediación de medio.(63)

La cepa aislada de suelo mostró un potencial interesante para la biorremediación de profenofos.

3.7. EXTRACCIÓN DE PROFENOFOS DEL MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo líquido fue contaminado con profenofos disolviendo una cantidad determinada del pesticida organofosforado (profenofos) en 5ml de acetonitrilo.

Se logró extraer profenofos del medio de cultivo líquido tomando una muestra de 2ml, usando como solventes la mezcla de hexano y acetato de etilo en una relación de 70:30, en presencia de 0.2g de cloruro de sodio, se sometió a baño ultrasonido por 5 minutos, una vez terminado se procedió a separar las fases por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos, terminado esto se extrajo el pesticida por separación de fases, este procedimiento se realizó por duplicado.

Una vez extraído el pesticida en la mezcla de solventes se eliminó el exceso de humedad usando 1g sulfato de sodio anhidro, después se procedió a evaporar los solventes de extracción (hexano y acetato de etilo) y pasado esto se reconstituyó con acetonitrilo hasta un volumen de 2ml. Esta muestra fue filtrada usando filtros anotop de 0.2um de diámetro de poro, luego esta solución fue analizada por HPLC a las condiciones cromatográficas ya establecidas.

Al final del proceso descrito anteriormente se consiguió identificar picos simétricos al mismo tiempo de retención que el estándar primario (minuto 3.2)

Para la cuantificación del profenofos extraído de las muestras este se valoró con la elaboración de dos curvas de calibración estos con diferentes rangos de concentración del analito, estas graficas de calibracion fueron elaboradas con estándar primario como se muestra en la **Figura 16**. En estas curvas de calibración fueron realizados por triplicado, se observa que coeficiente de determinación es de $r^2= 0.9986$ y $r^2= 0.9966$ respectivamente para cada una de las curvas de calibración.

Tabla 6: Determinación de gráficos de calibración estándar profenofos en HPLC.

PROFENOFOS				PROFENOFOS			
Concentración (mg/L)	Promedio	S	C.V (%)	Concentración (mg/L)	Promedio	S	C.V (%)
5	69671	306.4	0.44	0.3	3548	101.89	2.87
9	121353.33	4172.42	3.44	0.8	9852.33	165.23	1.68
13	172665.67	5991.16	3.47	1.3	17797.67	167.86	0.94
17	227760.33	6273.39	2.75	1.8	23864.33	449.57	1.88
21	283894.33	11013.32	3.88	2.3	33416	738.37	2.21
25	340653.33	12416.77	3.64	2.8	39229.67	567.53	1.45
29	379664.33	4586.8	1.21				

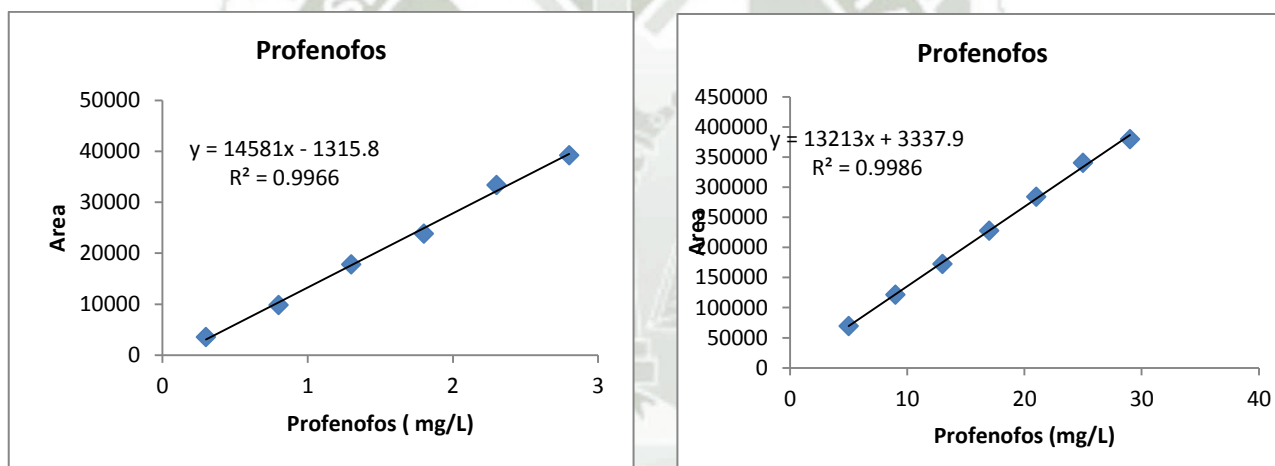


Figura 16 Curva de calibración estándar profenofos

En los ensayos de degradación de profenofos, en el tiempo cero de los tratamientos, se encontró una recuperación del pesticida a razón de 78.42% de extracción en promedio para los controles (testigos) y para las muestras con hongo el 79.38%.

Para uniformizar el proceso de extracción se determinó el porcentaje de recuperación, con estándar de profenofos esto por triplicado. Tabla 07. Donde se obtuvo que el porcentaje de

recuperación del analito fue de 78.45%. Para esa metodología (extracción líquido-líquido), la norma USP da como válido porcentajes de recuperación > 70 % (59) (60)

Tabla 7 Extracción líquido-líquido de profenofos cuantificadas en HPLC.

Área	Concentración Teórica (mg/L)	Concentración Real (mg/L)	% Recuperación	Desviación Estándar	% C.V.
194547	20	15.71	78.82%		
192465	20	15.43	78.17%	0.15	0.96
195366	20	15.67	78.35%		
PROMEDIO		15.61	78.45%		

Estos valores según lo reportado en la literatura son óptimos entendiendo que los procesos de extracción por agitación mecánica de plaguicidas en líquidos son bastante complejos, la solución compuesta por acetato de etilo, hexano, agua y minerales que se forman durante la agitación, el contenido de materia orgánica de las muestras, la temperatura del ambiente de agitación y la evaporación de los solventes, entre otros, son los factores que vienen a intervenir en la extracción.

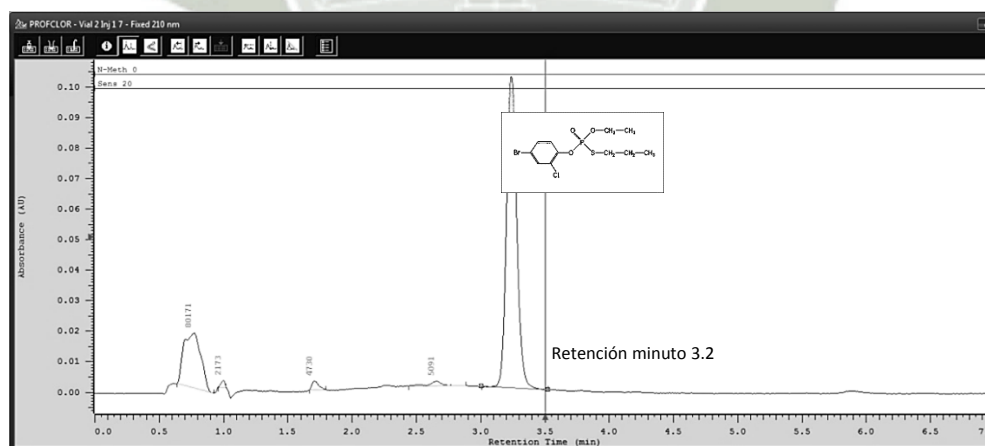


Figura 17 Cromatograma a 210 nm correspondiente a profenofos en la muestra de medio de cultivo líquido con tiempo de retención de 3.2 min.

3.8. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE PROFENOFOS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO.

EL análisis en HPLC mostró la biodegradación total de profenofos en todas las muestras después de los 21 días de incubación. Durante los primeros 10 días, hubo una disminución rápida en la concentración de profenofos en las muestras inoculadas con *Trichoderma sp*, mientras que el descenso ya no fue tan pronunciado a partir del día 10.

Los resultados indican que la cepa de *Trichoderma sp*, fue capaz de degradar profenofos incluso cuando otras fuentes de carbono estaban disponibles en el medio de cultivo, hasta el 98.12% (T1) a los 21 días de incubación, en comparación con el 20% de degradación observada en el control no inoculado con la cepa fúngica.

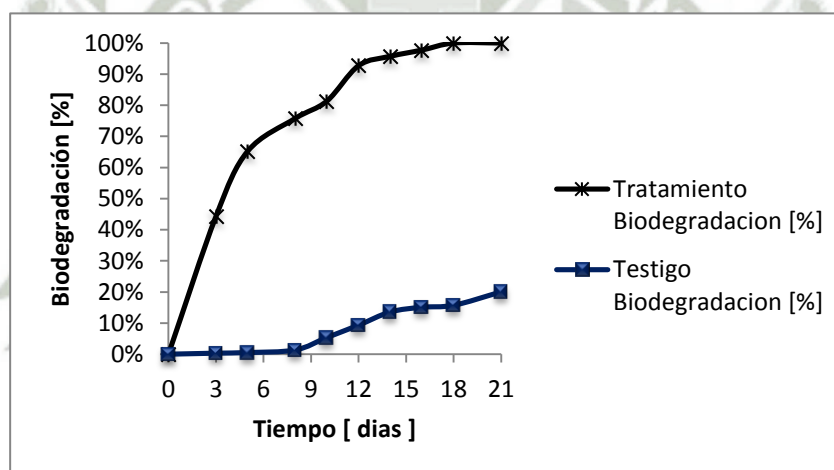


Figura 18 Cinética de degradación profenofos por la cepa fúngica.

3.8.1. Biodegradación de profenofos por la cepa de hongo *Trichoderma sp*.

A los 3 días de reacción, los extractos del micelio y medio líquido se sometieron a análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC, los análisis fueron realizados por triplicado, los datos referentes a la biodegradación de profenofos por la cepa fúngica de *Trichoderma sp*. Se resumen en la tabla 8.

Tabla 8 Cinética de degradación de profenofos

TIEMPO [Días]	TRATAMIENTO [mg/L]	Biodegradación [%]	TESTIGO [mg/L]	Biodegradación [%]
0	10.000	0.00%	10	0.00%
3	5.571	44.29%	9.967	0.33%
5	3.478	65.21%	9.947	0.53%
8	2.424	75.75%	9.865	1.35%
10	1.867	81.33%	9.463	5.37%
12	0.729	92.71%	9.067	9.33%
14	0.429	95.71%	8.642	13.58%
16	0.227	97.72%	8.491	15.09%
18	0.160	98.12%	8.428	15.72%
21	<LC	<LC	7.997	20.03%

El porcentaje de biodegradación:

$$B \% = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} * 100 \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 01}$$

- **C_i** : Concentración inicial (mg/L)
- **C_f** : Concentración final (mg/L)

Las reacciones triplicadas en las unidades experimentales con la cepa fúngica concordaron entre sí: con un promedio de 44.29% a los 3 días, de profenofos degradado. Debe también considerarse que aunque las reacciones se realizaron por triplicado, se producen independientemente y son, por lo tanto, reacciones únicas.

Los datos pueden sugerir que el micelio fúngico está absorbiendo moléculas profenofos y, después de la metabolización, excretarla en el medio líquido. En

lugar de ser absorbido, también es posible que estas moléculas se adsorban a las membranas de células fúngicas.

La degradación de profenofos puede explicarse debido que existirían enzimas intracelulares degradadoras de este pesticida. De acuerdo con Mulchandani, la enzima organofosfato hidrolasa se encuentra dentro de las células y para que se produzca la biodegradación, el pesticida debe ser transportado al interior de la célula.(64)

La reacción a los 21 días para profenofos, en ausencia de micelio fúngico, se realizó con el fin de determinar la tasa espontánea de hidrólisis del plaguicida en medio de cultivo líquido, esta reacción del hongo en ausencia de plaguicida, dio como resultado una disminución de profenofos en 20 %.

Las concentraciones de profenofos para la reacción en medio líquido con dextrosa y extracto de papa, en presencia de *Trichoderma sp*, se estimaron también por interpolación lineal del grafío de calibración para profenofos. Lo mismo se hizo para todas las concentraciones.

Se observó que la reacción de profenofos con *Trichoderma sp*, exhibió una baja tasa de biodegradación entre los 10 y 20 días de reacción comparado con la primera semana de reacción, como puede observarse en la Figura 16. De acuerdo con los datos de la bibliografía, la hidrólisis de organofosforados se realiza mediante la ruptura del enlace entre el átomo de fósforo y el grupo saliente (27, 65)

El cese de la actividad de biodegradación puede deberse al consumo completo de un nutriente limitante esencial, que también puede desempeñar un papel en su biodegradación ambiental.

Además, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), después de la hidrólisis se da la formación del 4-bromo-2-clorofenol, un metabolito producto de la degradación de profenofos, este último puede ser conjugado con otra molécula, puede reaccionar con una molécula del

metabolismo fúngico o incluso ser metabolizado completamente (66), que es lo que estaría ocurriendo en este caso.

EL estancamiento o la baja tasa de biodegradación en los últimos días puede ser causado por la muerte del hongo o que este haya alcanzado su fase de crecimiento estacionaria, después de que uno de los nutrientes en el medio líquido se hiciera escaso.

Las concentraciones finales de profenofos en 21 días reacción de biodegradación con *Trichoderma sp*, estimadas fueron de muy baja concentración, como se mencionó anteriormente. La biodegradación del plaguicida en presencia de este hongo fue casi completa, lo que sugiere que este tiene un mayor potencial biocatalítico para la degradación de profenofos.

Se puede inferir el promedio de vida media de profenofos para el presente trabajo es de 21 días esto en presencia de *Trichoderma sp*, por ende en un sistema enzimático, esto en comparación con lo obtenido por Alvarenga y Silva tiempo de vida meda de 20 días para el caso de clorpirifos.(67),(68)

Los resultados para la biodegradación de profenofos fueron satisfactorios, ya que hubo una degradación (o conversión) casi completa por parte de la cepa fúngica. Sin embargo, no fue posible identificar los metabolitos que pudieran haber formado o no producto de la biodegradación.

A través de la reacción de control del profenofos en ausencia del hongo (y por lo tanto sin enzimas), se evaluó la hidrólisis espontánea del plaguicida en el medio. Este experimento reveló una degradación de alrededor del 20%, lo que indica que este pesticida no es tan persistente en el medio ambiente, en comparación con otros plaguicidas, como los organoclorados. Sin embargo, aproximadamente el 80% del plaguicida no se degradó, mostrando que el proceso enzimático es altamente efectivo para promover la biodegradación de profenofos.

3.8.2. Modelo cinético de degradación.

Los resultados obtenidos de la degradación fueron procesados y/o analizados haciendo uso del software *Origin Pro 8.0*, se usó el modelo matemático con el más alto grado de correlación, el que mejor se ajustó al comportamiento cinético de biodegradación de los datos obtenidos.

Y es así que basándonos en el valor del coeficiente de determinación R^2 del modelo que *Origin Pro 8.0* ofrece, se eligió el modelo ExpDec1, ya que este presenta una mejor correlación y ajuste a los datos experimentales, este modelo trabaja con la siguiente ecuación:

$$y = A1 * e^{(-\frac{x}{t1})} + y0 \dots\dots\dots \text{Ecuación 02}$$

Dónde:

- **Y**: Es la cantidad Profenofos (mg/L)
- **Y0**: Factor de corrección de la concentración inicial del pesticida en un tiempo cero.
- **A1**: Constante, Factor de frecuencia o preexponencial.
- **t1**: Constante de velocidad (días).
- **x**: Representa el tiempo en días.

Tabla 9 Biodegradación de Profenofos a 25 °C, valores cuantificados por HPLC – DAD vs curva de ajuste de Origin Pro

TIEMPO [Días]	PROFENOFOS [mg/L]	PROFENOFOS MODELO ORIGIN PRO[mg/L]
0	10	9.927
3	5.571	5.635
5	3.478	3.838
8	2.424	2.122
10	1.867	1.404
12	0.729	0.907
14	0.429	0.562
16	0.227	0.323
18	0.158	0.157
21	<LC	--

- LC: límite de cuantificación.

La concentración de profenofos a tiempo cero, representa la concentración inicial del pesticida, antes de ser sometido al contacto con la cepa de hongo *Trichoderma sp.* Se describen 10 puntos de muestreo en un total de 21 días.

Tabla 10 Valores obtenidos al analizar los datos en Origin 8.0 y descripción de la ecuación.

Biodegradación de Profenofos	
Variable	Valor
Y0 :	-0.21669
A1 :	10.14395
T1 :	5.4529
Valor R ²	0.992

$$f(x) = 10.14395 * e^{\left(-\frac{x}{5.4529}\right)} + (-0.21669)$$

Con estos datos, el software nos muestra el comportamiento cinético de biodegradación de profenofos realizado a 25°C.

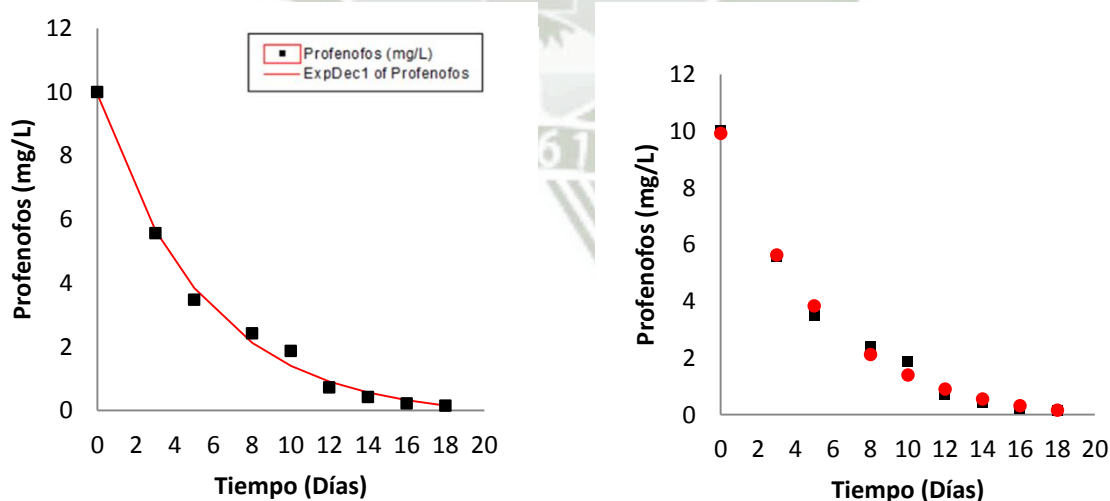


Figura 19 Biodegradación de Profenofos a 25°C vs el modelo cinético de degradación propuesto por Origin Pro.

3.9. BIODEGRADACIÓN DE PROFENOFOS.

Se evaluó la biodegradación del profenofos, utilizando *Trichoderma sp.* El equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución se utilizó para monitorear la desaparición del profenofos. A los 21 días de incubación, la intensidad del área disminuyó con el tiempo de incubación. La muestra extraída a los 21 días mostro un pequeño pico en el cronograma lo que indicaría una degradación alta de profenofos.

En el presente trabajo de investigación se desarrolló un diseño factorial completo siendo los factores a evaluar, el pesticida, el inóculo y la temperatura, dándonos en total 8 tratamientos y 24 unidades experimentales.

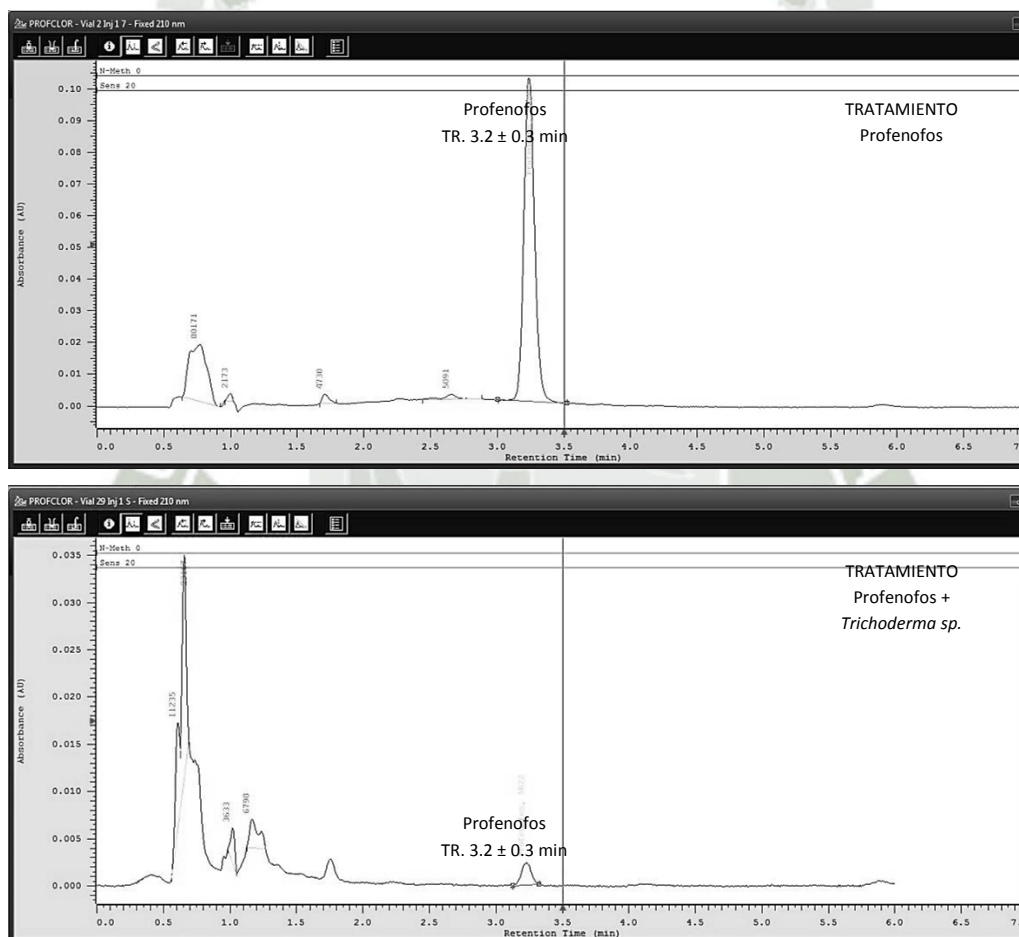
Por lo tanto, este organismo ha degradado profenofos por la hidrólisis enzimática. Se sabe que la enzima organofosfato hidrolasa está implicada en la degradación de una amplia gama de pesticidas organofosforados. (69)

Tabla 11 Diseño factorial completo: Factores: pesticida, inóculo y temperatura.

Tratamiento	Concentración	Concentración	Temperatura
	Pesticida (mg/L)	Inóculo (U)	(°C)
M1	30	1.00E+04	15
M2	10	1.00E+04	15
M3	30	1.00E+04	25
M4	10	1.00E+04	25
M5	30	1.00E+06	15
M6	10	1.00E+06	15
M7	30	1.00E+06	25
M8	10	1.00E+06	25

Se tomaron muestras al inicio y al final del ensayo y se determinaron la concentración de profenofos por HPLC, bajo las condiciones de extracción y determinación ya establecidas.

Con el fin de evaluar la biodegradación del pesticida profenofos a diferentes concentraciones, los resultados fueron satisfactorios, con 97% de degradación de profenofos. Este ensayo demostró que en un medio líquido, así como en medios sólidos, el hongo *Trichoderma sp*, era resistente a diferentes concentraciones del pesticida y mostró un excelente potencial para la biodegradación de profenofos. En el control profenofos, en ausencia del hongo, se observó una degradación de sólo el 20% en un periodo de 21 días a una concentración de 30.0 mg/L, confirmando que la presencia de hongos acelera la reacción de degradación, posiblemente por acción de enzimas fosfotriesterasas.



biodegradación de pesticidas organofosforados, Kanekar y colaboradores resumieron las vías de biodegradación de profenofos este pesticida se degrada principalmente a través del proceso de hidrólisis. (3, 69)

En la tabla 08 se puede observar que todos los tratamientos a los 21 días de reacción, donde interaccionaron tanto pesticida con el hongo y la temperatura lograron disminuir el nivel de profenofos.

En el tratamiento M4 donde interaccionan el hongo, la concentración de pesticida y la temperatura a $1E+4$ conidios, 10 mg/L y 25°C respectivamente, fue el que obtuvo el mayor porcentaje de biodegradación con 97.70 % para profenofos. Similar resultado obtuvo el tratamiento M8 con $1E+6$ conidios, 10 mg/L profenofos y 25°C con 97.40% de biodegradación para profenofos.

En el tratamiento M1 donde interaccionan el hongo, la concentración de pesticida y la temperatura a $1E+4$ conidios, 30 mg/L y 15°C respectivamente, fue el que obtuvo el menor porcentaje de biodegradación con 58.70 % para profenofos.

La biodegradación del pesticida profenofos podría ser resultado de la liberación cuantitativa de sus iones fosfato. El presente estudio demuestra que *Trichoderma harzianum* posee la capacidad de degradar organofosforados. Estos hallazgos podrían aplicarse en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas organofosforados.

Briceño y colaboradores afirman que los microorganismos degradadores de organofosforados poseen una enzima fosfoesterasa que hidroliza los enlaces O-P, deja el átomo de fósforo disponible para la absorción como fuente de fósforo y libera etanol para su utilización como fuente de carbono.(70)

El fósforo está usualmente presente como un éster de fosfato, Al ser ésteres tienen muchos sitios que son vulnerables a la hidrólisis. Las principales reacciones implicadas son hidrólisis, oxidación, alquilación y desalquilación.(3) La degradación microbiana a través de la hidrólisis de los enlaces P-O-alquilo y P-O-arilo se considera el paso más significativo en la desintoxicación

Se puede inferir que esta hidrólisis del pesticida organofosforado estaría conduciendo a una reducción en su toxicidad, los estudios sobre el metabolismo completo de los subproductos de profenofos no han sido realizados, pero pueden postularse etapas hipotéticas de hidrólisis de Ester fosfórico produciendo mono Ester y finalmente fosfato inorgánico, esta vía no se ha estudiado específicamente. Wolfenden & Spence describieron que en *Klebsiella aerogenes*, tanto fosfo-monoesterasa y diesterasa degradaron fosfato de metilo, esto se producía solo en ausencia de fosfato inorgánico en el medio de crecimiento.(71)

También Bumpus nos indica que clorpirifos se mineralizo por completo por el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, el cual hidrolizó clorpirifos luego el anillo piridinilo se sometió escisión antes de convertirse a dióxido de carbono y agua(72), algo bastante similar estaría ocurriendo con la degradación de profenofos por parte de *Trichoderma sp.*

Se ha informado previamente de la degradación de diferentes plaguicidas a altas concentraciones por microorganismos .(73),(7)

Se han descubierto una serie de enzimas capaces de desintoxicar los pesticidas organofosforados (PO) y la mayoría pertenece a la clase de fosfotriesterasas (PTE). La biodegradación de los PO con bacterias ha sido ampliamente reportado en la literatura.(74),(75),(76) Sin embargo, la biodegradación de hongos ha sido sub explorada en comparación con estudios sobre bacterias. Los hongos degradan una gran variedad de compuestos a través de un proceso conocido como mico degradación.(77)

Las fosfotriesterasas de hongos son una fuente prometedora de enzimas degradantes que exhiben propiedades únicas, una vez que se derivan de organismos.(78),(79)

La vía metabólica de profenofos en plantas de algodón implica la división del enlace éster fosforotioato para producir *4-bromo-2-clorofenol*, seguido de conjugación con glucosa.(80)

Los hongos filamentosos del género *Aspergillus* se han utilizado en la biodegradación de OPs. Por ejemplo, *Aspergillus niger* mostró una alta biodegradación del plaguicida de malatión.(77) *Aspergillus flavus* y *Aspergillus sydowii* fueron capaces de degradar pirimifosmetilo, pirafós y malatión, incluso a altas concentraciones.

Los OP son particularmente susceptibles a la biodegradación porque son susceptibles a la hidrólisis por enzimas.(64) Las enzimas más conocidas que promueven la hidrólisis de OP son las fosfotriesterasas (81). El metabolito esperado de la hidrólisis de profenofos es 4-bromo-2-clorofenol. Sin embargo, la presencia de enzimas aceleraría el proceso de degradación.(82)

De acuerdo con los datos de la literatura, la hidrólisis de organofosforados procede rompiendo el enlace entre el átomo de fósforo y el grupo saliente.(27),(65) Por lo tanto, la concentración de profenofos degradados debe ser aproximadamente la misma que la concentración de metabolito formado, donde hay degradación total del pesticida al metabolito. Sin embargo, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), después de la hidrólisis y formación del 4-bromo-2-clorofenol, este último puede ser conjugado con otra molécula, puede reaccionar con una molécula del metabolismo fúngico o incluso ser metabolizado.(66)

Debe observarse, además, que la hidrólisis espontánea no favorece la degradación del metabolito, al igual que el sistema enzimático, Aly y Badway discutieron la hidrólisis de profenofos a 20 ° C con soluciones tamponadas a pH 5, 7 y 9. Se produjo una pérdida del 50% en 106 días a pH 5.5 y 43 días a pH 7(83).

Trichoderma sp, en presencia de profenofos estaría produciendo enzimas del tipo fosfotriesterasas u otra clase de enzimas que son capaces de degradar pesticidas organofosforado como profenofos, ya que esto también se demuestra en estudios realizados por Alvarenga y Margesh donde degradaron clorpirifos, induciendo la producción de fosfotriesterasas pro parte de *Aspergillus CBMA*. *Trichoderma sp*, estaría usando el mismo sistema para la degradación de profenofos.(67),(84) Karanth, declaró que el potencial de los microorganismos para degradar y eliminar los plaguicidas del medio ambiente se está realizando con éxito.(85)

Tabla 12 Degradación de profenofos por *Trichoderma sp.* A los 21 días.

Tratamiento	Concentración Pesticida (mg/L)	Concentración Inóculo (U)	Temperatura (°C)	Degradación (%)	ST	CV (%)
M1	30	1.00E+04	15	58.70%	0.01	2.15%
M2	10	1.00E+04	15	95.60%	0.01	0.59%
M3	30	1.00E+04	25	95.23%	0.01	1.49%
M4	10	1.00E+04	25	97.70%	0.01	0.74%
M5	30	1.00E+06	15	74.27%	0.01	1.63%
M6	10	1.00E+06	15	97.10%	0.01	1.24%
M7	30	1.00E+06	25	84.23%	0.00	0.38%
M8	10	1.00E+06	25	97.40%	0.01	0.67%

3.10. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CEPA FÚNGICA.

El efecto de la temperatura sobre la biodegradación del plaguicida depende de la estructura molecular del plaguicida. La temperatura afecta la hidrólisis del pesticida en el medio de cultivo. Con el aumento de temperatura, se estimula el mayor crecimiento y la actividad de los microorganismos en los suelos.

Existe una relación directa entre la temperatura y la concentración de pesticidas en el medio de cultivo. A temperatura más baja, la persistencia del pesticida en el medio de cultivo es mayor.

Se encontró que la degradación máxima del tratamiento con 30 mg/L de profenofos fue de 95.23% a 25 ° C y la menor fue de 58.39% a 15 ° C, por la cepa fúngica.

Según Ma y Wang La temperatura tiene un papel significativo en el proceso de biorremediación de profenofos. (86)

Wang y colaboradores informaron que la tasa de degradación de organofosforados por *B. laterosporus* en cultivos puros se vio afectada por la temperatura que mostró un orden de

35°C > 25°C > 15°C. Los resultados mostraron que el aumento de temperatura aumenta la tasa de degradación de organofosforados (4, 86)

Muchos autores coinciden en cuanto a las condiciones de temperatura que debiera existir para degradar pesticidas organofosforados, muchos autores indican que la temperatura ideal oscila alrededor de los 25 °C, esto coincide con lo obtenido en el presente trabajo ya que la temperatura influyo directamente en el proceso de degradación de profenofos y se obtuvo mejor porcentaje de biodegradación a 25 °C.(87-90)

3.11. DIAGRAMA DE PARETO.

También se desarrolló diagramas de Pareto de efectos de los factores *Trichoderma sp.* Profenofos y temperatura frente a su responsabilidad en los efectos de degradación **Figura 21** Para este caso los factores individuales A y C y los factores AC y BC en conjunto si interfieren en el proceso de biodegradación ya que los valores de efecto estandarizado son mayores a 2.

El factor inculo no sobrepasa el valor mínimo para el efecto estandarizado (2) lo cual nos diría que no afecta en el proceso de biodegradación.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Degradacion

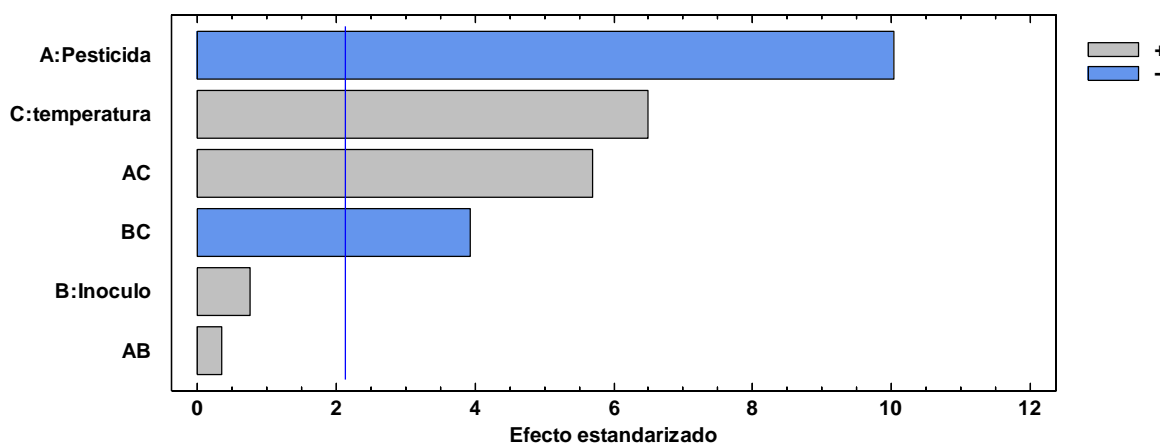


Figura 21 Diagrama de Pareto para la biodegradación de profenofos.

CONCLUSIONES

1. Se aisló e identificó la cepa del hongo a partir de la muestra de suelo agrícola proveniente de la zona de Zamacola distrito de Cerro Colorado provincia de Arequipa, presentando una similitud del 100% con la secuencia ITS1 de la especie *Trichoderma harzianum*, por lo tanto es la especie más cercana, y podría confirmarse que la cepa 9-hongocutipa corresponde a la especie *Trichoderma harzianum*.
2. La cepa de hongo mostró crecimiento y tolerancia en concentraciones que oscilan entre 10 y 100 mg / L de profenofos en placas con medio de cultivo sólido (PDA). El hongo aislado mostró diferentes grados de sensibilidad hacia el pesticida profenofos, para los tratamientos de 10, 30, 50 y 100 mg/L mostró inhibiciones en su crecimiento micelial a razón de 0.00%, 47.06%, 70.59% y 83.92% respectivamente en 4 días.
3. Se obtuvo el mejor porcentaje de biodegradación de 97.60% para el tratamiento M4 con 10 mg/L profenofos $1E+4$ conidios y 25 °C, y el menor porcentaje de biodegradación para el tratamiento M1 con 30 mg/L profenofos $1E+4$ conidios y 15 °C con 57.99%, en 21 días de incubación, estos resultados se obtuvieron incluso cuando otras fuentes de carbono estaban disponibles en el medio de cultivo hubo un 20% de degradación en el tratamiento control no inoculado con la cepa fúngica.

RECOMENDACIONES

- El enfoque más prometedor para reducir la presencia de contaminantes en el medio ambiente es la biorremediación por microorganismos, ya que existen en abundancia en el medio ambiente.



BIBLIOGRAFIA.

1. Zhu G, Wu H, Guo J, Kimaro FM. Microbial degradation of fipronil in clay loam soil. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2004;153(1-4):35-44.
2. Semple KT, Morriss A, Paton G. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European journal of soil science*. 2003;54(4):809-18.
3. Singh BK, Walker A, Wright DJ. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: influence of different environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 2006;38(9):2682-93.
4. Fang H, Xiang YQ, Hao YJ, Chu XQ, Pan XD, Yu JQ, et al. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2008;61(4):294-303.
5. Hafez H, Thiemann W, editors. Persistence and biodegradation of diazinone and imidacloprid in soil. *Proc XII Symp Pest Chem, Congress Centre Universita Cattolica, Via Emilia Parmense*; 2003.
6. Araújo Ad, Monteiro R, Abarkeli R. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*. 2003;52(5):799-804.
7. Schuster E, Schröder D. Side-effects of sequentially-applied pesticides on non-target soil microorganisms: field experiments. *Soil Biology and Biochemistry*. 1990;22(3):367-73.
8. Elliott L, Lynch J, Papendick R. The microbial component of soil quality" *Soil biochemistry*". Ed G Stotzky, JM Bollag. 1996:1-22.
9. Navalon A, Prieto A, Araujo L, Vilchez JL. Determination of oxadiazon residues by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2002;946(1):239-45.
10. Silgoner I, Krska R, Lombas E, Gans O, Rosenberg E, Grasserbauer M. Microwave assisted extraction of organochlorine pesticides from sediments and its application to contaminated sediment samples. *Fresenius' journal of analytical chemistry*. 1998;362(1):120-4.
11. Vacondio B, Birolli WG, Ferreira IM, Selegim MH, Gonçalves S, Vasconcellos SP, et al. Biodegradation of pentachlorophenol by marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* CBMAI 1677 isolated from ascidian *Didemnum ligulum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2015;4(2):266-75.

12. Bhalerao TS, Puranik PR. Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2007;59(4):315-21.
13. Barr DP, Aust SD. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science & Technology*. 1994;28(2):78A-87A.
14. Bartha R, Lanzilotta R, Pramer D. Stability and effects of some pesticides in soil. *Applied microbiology*. 1967;15(1):67-75.
15. Burken JG, Schnoor JL. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental science & technology*. 1997;31(5):1399-406.
16. Su C. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: situation, impact and remediation techniques. *Environmental Skeptics and Critics*. 2014;3(2):24.
17. de la Cruz E, Bravo-Durán V, Ramírez F, Castillo LE. Environmental hazards associated with pesticide import into Costa Rica, 1977-2009. *Journal of environmental biology*. 2014;35(1):43.
18. Organization WH. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas: directrices para el control de calidad de plaguicidas. 2011.
19. López-Geta J, Martínez-Navarrete C, Moreno-Merino L, Navarrete-Martínez P. Las aguas subterráneas y los plaguicidas. Instituto Geológico y minero de España. 1992.
20. Garrido T, Costa C, Fraile J, Orejudo E, Niñerola J, Ginebreda A, et al. Análisis de la presencia de plaguicidas en diversos acuíferos de Cataluña. Barcelona, España. 1998.
21. de Plaguicidas CO. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. CICOPLAFEST; 1998.
22. Organization WH. Guidelines for drinking-water quality: World Health Organization; 2004.
23. Waliszewski SM, Meza Hernández MV, Infanzón RM, Trujillo P, Morales Guzmán MI. Niveles de plaguicidas organoclorados persistentes en mujeres con carcinoma mamario en Veracruz. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 2003;19(2).
24. Ferrer A, Cabral R. Collective poisonings caused by pesticides: mechanism of production-mecharrism of prevention. *Journal of Environmental Toxicology*. 1993(5):161-201.
25. Narahashi T, Frey J, Ginsburg K, Roy M. Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicology letters*. 1992;64:429-36.
26. Tordoir WF, van Sittert NJ. Organochlorines. *Toxicology*. 1994;91(1):51-7.

27. Sogorb MA, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology letters*. 2002;128(1):215-28.
28. Perry AS, Yamamoto I, Ishaaya I, Perry RY. *Insecticides in agriculture and environment: retrospects and prospects*: Springer Science & Business Media; 2013.
29. Prieto F, Cortés S, Gaytán J, Ceruelos A, Vázquez P. Pesticides: Classification, Uses and Toxicity. Measures of Exposure and Genotoxic Risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*. 2012;1:3-23.
30. Wild D. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1975;32(2):133-49.
31. Moutschen-Dahmen J, Moutschen-Dahmen M, Degraeve N. Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of insecticides. *Mutagenicity, Carcinogenicity, and Teratogenicity of Industrial Pollutants*: Springer; 1984. p. 127-203.
32. González P. Riesgos químicos por uso de plaguicidas en el medio ambiente. *Federació de serveis i administracions publiques*. 2004.
33. PNUMA O. Impacto en la salud pública de los plaguicidas usados en agricultura. . 1990.
34. Brady NC, Weil RR. *The nature and properties of soil* 12th ed. Prentice-Hall Inc. Upper Saddle River, New Jersey; 1999.
35. Boroukhovitch M. *Plaguicidas y medio ambiente. Plaguicidas Agrícolas y*. 1992.
36. Wesseling C. *Health effects from pesticide use in Costa Rica: an epidemiologic approach*1997.
37. Sprankle P, Meggitt W, Penner D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*. 1975;23(3):229-34.
38. Karalliedde L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. *Anaesthesia*. 1999;54(11):1073-88.
39. EPA. Organophosphate Insecticides
https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/rmpp_6thed_ch5_organophosphates.pdf
[https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/rmpp_6thed_ch5_organophosphates.pdf Available from:
https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/rmpp_6thed_ch5_organophosphates.pdf
40. Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental health perspectives*. 1990;87:245.

41. Spencer E, O'brien R. Chemistry and mode of action of organophosphorus insecticides. *Annual Review of Entomology*. 1957;2(1):261-78.
42. ZHAO W-y, SHEN C-l, DING N, JIA S-m, FAN Z-x. Residual Analysis of Profenofos in Cotton and Soil [J]. *Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition)*. 2008;4:006.
43. Abass K, Reponen P, Jalonen J, Pelkonen O. In vitro metabolism and interaction of profenofos by human, mouse and rat liver preparations. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2007;87(3):238-47.
44. Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica chimica acta*. 2006;366(1):1-13.
45. Agrios G. *Fitopatología*. 5ª reimpresión de la 2ª edición. Editorial Limusa, México. 1996.
46. Gams W, Bissett J. Morphology and identification of Trichoderma. *Trichoderma and Gliocladium*. 1998;1:3-34.
47. Elósegui O. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. La Habana-Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). 2006:6-8.
48. Porto ALM, Melgar GZ, Kasemodel MC, Nitschke M. Biodegradation of pesticides. *Pesticides in the Modern World-Pesticides Use and Management: InTech*; 2011.
49. Ghosh PG, Sawant NA, Patil S, Aglave B. Microbial biodegradation of organophosphate pesticides. *International journal of biotechnology and biochemistry*. 2010;6(6):871-6.
50. Brasil R. Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rondinha-Rio Grande do Sul. *Quim Nova*. 2008;31(7):1631-5.
51. Karpouzas DG, Singh BK. Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Advances in microbial physiology*. 2006;51:119-225.
52. Elad Y, Chet I, Henis Y. A selective medium for improving quantitative isolation of Trichoderma spp. from soil. *Phytoparasitica*. 1981;9(1):59-67.
53. Flegel T. Semipermanent microscope slides of microfungi using a sticky tape technique. *Canadian journal of microbiology*. 1980;26(4):551-3.
54. MA. R. A revision of the genus Trichoderma. *Mycol Pap*. 1969:116.
55. Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*. 1985;228:1434-7.

56. Alvarenga N, Birolli WG, Selegim MHR, Porto ALM. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. *Chemosphere*. 2014;117:47-52.
57. Birolli WG, Yamamoto KY, de Oliveira JR, Nitschke M, Selegim MHR, Porto ALM. Biotransformation of dieldrin by the marine fungus *Penicillium miczynskii* CBMAI 930. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2015;4(1):39-43.
58. Gonzales Condori EG. Evaluación del Desempeño de *Eisenia Foetida* (Lmobríz Roja Californiana) en la Degradación de los Pesticidas Organofosforados Clorpirifos y Profenofos en Suelos Arequipa-2014. 2016.
59. Pharmacopoeia U, XXII U. Validation of compendial methods. USP-26-NF21, 2003.
60. Quattrocchi OA, de Andrizzi SIA, Laba RF. Introducción a la HPLC: aplicación y práctica: Artes Gráficas Farro; 1992.
61. Ferré J. El diseño factorial completo 2^2 . *TECNICAS DE LABORATORIO-BARCELONA-*. 2003:984-9.
62. Pelczar MJ CE, Krieg NR. . *Microbiologia Books SPPMBM*, editor1997.
63. Lamar RT, Dietrich DM. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(10):3093-100.
64. Chen W, Mulchandani A. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. *Trends in biotechnology*. 1998;16(2):71-6.
65. Bigley AN, Raushel FM. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013;1834(1):443-53.
66. Nations FFaAOotU. profenofos. *JMPR*. 2012.
67. Alvarenga N, Birolli WG, Selegim MH, Porto AL. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. *Chemosphere*. 2014;117:47-52.
68. Silva N, Birolli W, Selegim M, Porto A. Applied bioremediation-active and passive approaches. *Rijeka(385): InTech*. 2013.
69. SARNAIK SS. Biodegradation of organophosphorus pesticides. *Proc Indian natn Sci Acad B70 No*. 2004;1:57-70.
70. Briceno G, Fuentes M, Palma G, Jorquera M, Amoroso M, Diez M. Chlorpyrifos biodegradation and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012;73:1-7.

71. Wolfenden R, Spence G. Derepression of phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in *Aerobacter aerogenes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. 1967;146(1):296-8.
72. Bumpus JA, Kakar SN, Coleman R. Fungal degradation of organophosphorous insecticides. *Applied biochemistry and biotechnology*. 1993;39(1):715-26.
73. Karpouzas D, Morgan J, Walker A. Isolation and characterization of 23 carbofuran-degrading bacteria from soils from distant geographical areas. *Letters in applied microbiology*. 2000;31(5):353-8.
74. Anwar S, Liaquat F, Khan QM, Khalid ZM, Iqbal S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;168(1):400-5.
75. Xu G, Li Y, Zheng W, Peng X, Li W, Yan Y. Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp. *Biotechnology letters*. 2007;29(10):1469-73.
76. Zheng Y, Lan W, Qiao C, Mulchandani A, Chen W. Decontamination of vegetables sprayed with organophosphate pesticides by organophosphorus hydrolase and carboxylesterase (B1). *Applied biochemistry and biotechnology*. 2007;136(3):233-41.
77. Ramadevi C, Nath MM, Prasad MG. Mycodegradation of malathion by a soil fungal isolate, *Aspergillus niger*. *Int J Basic Appl Chem Sci*. 2012;2:108-15.
78. Trincone A. Potential biocatalysts originating from sea environments. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010;66(3):241-56.
79. Sarkar S, Pramanik A, Mitra A, Mukherjee J. Bioprocessing data for the production of marine enzymes. *Marine Drugs*. 2010;8(4):1323-72.
80. Capps TM, Barringer VM, Eberle WJ, Brown DR, Sanson DR. Identification of a unique glucosylsulfate conjugate metabolite of profenofos in cotton. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1996;44(8):2408-11.
81. Ghanem E, Raushel FM. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;207(2):459-70.
82. Zamy C, Mazellier P, Legube B. Analytical and kinetic study of the aqueous hydrolysis of four organophosphorus and two carbamate pesticides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2004;84(14-15):1059-68.
83. Aly OA, Badawy MI. Hydrolysis of organophosphate insecticides in aqueous media. *Environment International*. 1982;7(6):373-7.

84. Margesin R, Schinner F. Phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphotriesterase, and inorganic pyrophosphatase activities in forest soils in an alpine area: effect of pH on enzyme activity and extractability. *Biology and fertility of soils*. 1994;18(4):320-6.
85. Karanth N. Abatement of pesticide residues through biodegradation. *Environment and Degradation*. 1992:243-52.
86. Ma J, Wang S, Wang P, Ma L, Chen X, Xu R. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2006;63(3):456-62.
87. Abo-Amer AE. Characterization of a strain of *Pseudomonas putida* isolated from agricultural soil that degrades cadusafos (an organophosphorus pesticide). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012;28(3):805-14.
88. Zhao R-B, Bao H-Y, Liu Y-X. Isolation and Characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for Biodegradation of Methamidophos. *Agricultural Sciences in China*. 2010;9(5):695-703.
89. Zhang X-H, Zhang G-S, Zhang Z-H, Jian-Hong X, Shun-Peng L. Isolation and Characterization of a Dichlorvos-Degrading Strain DDV-1 of *Ochrobactrum* sp. 11Project supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(Nos. 2001AA214121, 2002AA246081 and 2003AA241150), the National Key Technologies Research and Development Program of China during the 9th Five-Year Plan Period (No. 2002BA516A01) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30400013). *Pedosphere*. 2006;16(1):64-71.
90. Hong Q, Zhang Z, Hong Y, Li S. A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using *Burkholderia* sp. FDS-1. *International biodeterioration & biodegradation*. 2007;59(1):55-61.

ANEXOS

1. Registro de la secuenciación GenBank.

The image displays two screenshots of a GenBank sequence viewer interface. The top screenshot shows the raw DNA sequence for the locus 9-hongocutipa ITS1F, which is 586 bp long. The sequence is displayed in a monospaced font with line numbers on the left. The bottom screenshot shows the corresponding GenBank record, which includes metadata such as the locus name, definition, accession number, version, source, organism, reference, comment, and features. The features section includes location/qualifiers for the source and rRNA, and a base count table.

Raw DNA Sequence (Top Screenshot):

```

lcl|9-hongocutipa ITS1F: raw. dna len= 586

TITLE Isolation and identification of Trichoderma sp, from agricultural
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 586)
AUTHORS Cutipa-Luque,J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-JUL-2017) Environmental Biotechnology, Catholic
University of Santa Maria, Urb. San Jose. San Jose s/n. Yanahuara.
Peru, Arequipa, Arequipa, Peru
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..586
/organism="Trichoderma harzianum"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="AG 1"
/isolation_source="Soil agricultural contaminated by
pesticides"
/notes="[cultured; wizard]"
<1..586
rRNA /product="18S ribosomal RNA"
BASE COUNT 130 a 173 c 151 g 132 t
ORIGIN
1 cggaggagtc attaccgagt ttacaactcc caaacccaat gtgaacgtta ccaaaactgtt
61 gcttcggcgg gatctctgcc cgggttcggt cgaagccccc gaccacggcg ccggcggag
121 gaccaaccaa aactcttatt gtataccccc tcgctgggtt ttattataat ctgagccttc
181 tcggcgctcc tcgtaggctc tcgasaatg aatcaaaact tcaacaacg gatctcttgg
241 ttctgcctac gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag
301 tgaatcctcg aactcttgaa cgcacattgc gccgcacagt attctggcgg gcatgctcgt
361 ccaagcgcga ttaaacacct cgaaccccc cgggggtcgc gctgtgggga tcggcctcgc
421 ctctggcgtg ccgctctccg aaatacagtg gcgctctcgc cgaagcctct cctgcgcagt
481 agtttgaca ctgcactcgg gagcggcggc cgtccacagc cgttaaacac ccaactctg
541 aatgttgc ctccgatcag gtggaatac ccgctgaact taagca
//
    
```

GenBank Record (Bottom Screenshot):

```

LOCUS 9-hongocutipa ITS1F 586 bp DNA linear 18-JUL-2017
DEFINITION TRIM QUALITY: 20.
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Trichoderma harzianum
ORGANISM Trichoderma harzianum
Unclassified.
REFERENCE 1 (bases 1 to 586)
AUTHORS Cutipa-Luque,J.
TITLE Isolation and identification of Trichoderma sp, from agricultural
soil for the degradation of pesticides (Arequipa,Peru)
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 586)
AUTHORS Cutipa-Luque,J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-JUL-2017) Environmental Biotechnology, Catholic
University of Santa Maria, Urb. San Jose. San Jose s/n. Yanahuara.
Peru, Arequipa, Arequipa, Peru
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..586
/organism="Trichoderma harzianum"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="AG 1"
/isolation_source="Soil agricultural contaminated by
pesticides"
/notes="[cultured; wizard]"
<1..586
rRNA /product="18S ribosomal RNA"
BASE COUNT 130 a 173 c 151 g 132 t
ORIGIN
1 cggaggagtc attaccgagt ttacaactcc caaacccaat gtgaacgtta ccaaaactgtt
    
```