



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
UNIDAD DE POSGRADO
MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL

Proyecto de Investigación previo la
obtención del Grado Académico de
Magíster en Gestión Ambiental.

TEMA

“CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS CON CAPACIDAD
BIORREMEDIADORA DE PESTICIDAS, *Piretroides* (CIPERMETRINA),
Organofosforados (*CLORPIRIFOS*) Y *N*-(*fosfonometil*) glicina (GLIFOSATO).”

AUTOR

ING. PABLO ANDRÉS MORRILLO ZAMBRANO

DIRECTOR

ING. HAYRON CANCHIGNIA MARTÍNEZ. PhD

Quevedo - Ecuador

Año 2017

CERTIFICACIÓN

Ing. Fabricio Canchignia Martínez Ph.D, en calidad de Director de Perfil de Investigación, previa la obtención de grado Académico de Magister en Gestión Ambiental

CERTIFICA

Que el Ing. PABLO ANDRÉS MORRILLO ZAMBRANO autor de Proyecto de Investigación titulado: “CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS CON CAPACIDAD BIORREMEDIADORA DE PESTICIDAS, *Piretroides* (CIPERMETRINA), Organofosforados (*CLORPIRIFOS*) Y *N*-(*fosfometil*) *glicina* (GLIFOSATO)”, ha sido revisada en todos sus componentes por lo que se autoriza su presentación entre el tribunal respectivo.

.....
Ing. Fabricio Canchignia Martínez, Ph.D

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **PABLO ANDRÉS MORRILLO ZAMBRANO** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

PABLO ANDRÉS MORRILLO ZAMBRANO

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por permitirme lograr esta meta en mi vida, también por darme a unos padres maravillosos, ya que, con sus esfuerzos, confianza, amor y apoyo incondicional, permitieron culminar mis estudios y poder ser un profesional. Este logro se los dedico plenamente a ellos.

A mi amada pareja que siempre estuvo pendiente de mi con cada palabra de aliento y por su apoyo incondicional en cada momento y circunstancia.

A mis hermanos por su apoyo moral y absoluto.

AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjó mis conocimientos.

A mi director de tesis, Dr. Hayron Canchignia Martínez, por su enseñanza y confianza para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

Al personal que conforma el laboratorio, por brindarme apoyo técnico y compartir experiencias que han sido de gran aporte para la culminación de este proyecto investigativo.

A mis docentes y personal administrativo por su amistad, confianza y soporte.

También a mi selecto grupo de compañeros de aula por su amistad, respeto y apoyo mutuo durante éste largo caminar para lograr el objetivo anhelado.

PABLO ANDRÉS MORRILLO ZAMBRANO

PRÓLOGO

Los contenidos presentados en la investigación “CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS CON CAPACIDAD BIORREMEDIADORA DE PESTICIDAS, *Piretroides* (CIPERMETRINA), Organofosforados (*CLORPIRIFOS*) Y *N*-(fosfometil) glicina (GLIFOSATO)” expone un trabajo investigativo de tipo experimental apoyado por información de manuscrito científicos relacionados a la degradación de pesticidas.

Este programa diversifica las opciones con el aislamiento de bacterias de uso para el suelo y con el paso de los años la recuperación de los recursos microbianos. Que permitirán neutralizar las sustancias tóxicas, ya sea transformándolas en sustancias menos tóxicas o haciéndolas inofensivas para el medio ambiente y la salud humana.

El Ecuador sufre severos efectos de contaminación por el empleo excesivo de pesticidas destinados al control de enfermedades, insectos y plagas. Con el interés de aumentar la productividad agrícola, aumentado la cantidad de trazas de pesticidas en los alimentos y causando daño a la diversidad microbiota del suelo. Una de las alternativas para la recuperación de los suelos contaminados con estos pesticidas se ha requerido de la ayuda de microorganismos. Dando paso a condiciones favorables tanto en clima como en calidad de suelo para garantizar un amplio porcentaje de éxito.

Este trabajo expone la existencia de bacterias capaces de adaptabilidad y emplear como única fuente de energía los pesticidas, haciendo factible la descomposición de los mismos. Observando diferencias significativas al desarrollo bacteriano y adaptabilidad, reduciendo el contenido de los pesticidas. Estos resultados cumplieron con la capacidad de seleccionar los microorganismos en condiciones adversas alterando sus funciones básicas, optimizando el uso de los recursos que los rodean como es el caso de fuentes de carbono alternas donde se encuentran los pesticidas *Piretroides*, Organofosforados y *N*-(fosfometil) glicina.

Ing. Jaime Morante Carriel, Ph.D

RESUMEN

El objetivo de la investigación es aislar y caracterizar el consorcio microbiano de lecho biológico (Biodep) con capacidad de biorremediación de piretroides (cipermetrina), organofosforados (clorpirifos) y N-fosfonometil glicina (glifosato). La importancia se centra en las altas tasas de plaguicidas utilizados para los problemas fitopatológicos que afligen al sector agrícola. El uso agrícola de los plaguicidas es un subconjunto del espectro más amplio de productos químicos utilizados en la sociedad moderna. La biorremediación utiliza la capacidad de los microorganismos para degradar los compuestos orgánicos. Esta tecnología se basa en el uso de organismos naturales o mejorados genéticamente para recuperar los sitios contaminados y proteger el medio ambiente. Las prácticas de biorremediación consisten principalmente en el uso de diferentes organismos (plantas, levaduras, hongos, bacterias, etc.) del medio para neutralizar las sustancias tóxicas, ya sea transformándolas en sustancias menos tóxicas o haciéndolas inofensivas para el medio ambiente y la salud humana. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de sustancias orgánicas por estos microorganismos, que los utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y energía para sus funciones metabólicas. Para la selección de la cepa microbiana, se llevará a cabo el crecimiento de todos los microorganismos aislados en medio de cultivo mineral sólido con adición de 0,5% de plaguicida, las dimensiones de desarrollo y adaptabilidad se evaluarán a los 2 y 6 días después de la inoculación en medio de cultivo.

Palabras clave: Bioestimulación, Biodegradación, caracterización microbiana, ciclo biológico, HPB, Medio de cultivo, plaguicidas, Pseudomonas.

ABSTRACT

The objective of the research is to isolate and characterize the biological bed microbial consortium (Biodep) with bioremediation capacity of pyrethroids (cypermethrin), organophosphorus (chlorpyrifos) and N-phosphonomethyl glycine (glyphosate). The importance is focused on the high rates of pesticides used for the phytopathological problems that afflict the agricultural sector. Agricultural use of pesticides is a subset of the broader spectrum of chemicals used in modern society. Bioremediation uses the ability of microorganisms to degrade organic compounds. This technology is based on the use of natural or genetically enhanced organisms to recover contaminated sites and protect the environment. Bioremediation practices consist mainly of the use of different organisms (plants, yeasts, fungi, bacteria, etc.) of the medium to neutralize toxic substances, either by transforming them into less toxic substances or by rendering them harmless to the environment and Human health. These decontamination systems are based on the absorption of organic substances by these microorganisms, which use them as the source of carbon necessary for their growth and energy for their metabolic functions. For the selection of the microbial strain, the growth of all the microorganisms isolated in solid mineral culture medium with addition of 0.5% of pesticide will be carried out, developmental and adaptability dimensions will be evaluated at 2 and 6 days after inoculation in medium of culture.

Key words: Biostimulation, Biodegradation, microbial characterization, biological cycle, BPH, culture medium, pesticides, *Pseudomonas*.

TABLA DE CONTENIDO

<i>PORTADA</i>	<i>i</i>
<i>CERTIFICACIÓN</i>	<i>ii</i>
<i>DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS</i>	<i>iii</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>iv</i>
<i>AGRADECIMIENTO</i>	<i>v</i>
<i>PRÓLOGO</i>	<i>vi</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>vii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>viii</i>
<i>TABLA DE CONTENIDO</i>	<i>ix</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>xii</i>
CAPÍTULO I.MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN	1
1.1 Ubicación y contextualización de la problemática	2
1.2 Situación actual de la problemática	3
1.3 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	4
1.3.1 Problema general	4
1.3.2 Problemas derivados	4
1.4 Delimitación del problema	4
1.5 Objetivos.....	5
1.5.1 General.....	5
1.5.2 Específicos	5
1.6 Justificación	5
CAPÍTULO II.MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN	8
2.1 Medio de cultivo	9
2.1.1 Microorganismos	9
2.1.2 Identificación microbiana	9
2.1.3 Bacteria	10
2.1.4 Hongos.....	10
2.1.5 Biodep.....	11
2.1.6 Plaguicidas.....	11
2.1.7 Microorganismos bioremediadores	14
2.2 Fundamentación teórica.....	15
2.2.1 Biodegradación del malatión utilizando microorganismos nativos.....	15
2.2.2 Degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo.....	16
2.2.3 Degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas	16
2.2.4 Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas	17
2.2.5 Evaluación del proceso de biorremediación de suelos contaminados.	18
2.2.6 Biorremediación de suelos contaminados por organoclorados.	19
2.2.7 Evaluación de la capacidad degradadora y biorremediación de bacterias.....	20
2.2.8 Secuencias del consenso intergénico repetidor enterobacteriano (ERIC) en Escherichia coli: evolución e implicaciones para ERIC-PCR	21
2.2.9 Funciones de los microorganismos en la naturaleza.....	21
2.2.10 Bacterias degradadoras.	21

2.2.11 Hongos descomponedores.	23
2.3 Fundamentación legal	24
2.3.1 Ley de Gestión Ambiental	24
2.3.2 Constitución Política del Ecuador (2008)	25
2.3.3 Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria.	27
CAPÍTULO III.METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	29
3.1 tipo de investigación	30
3.1.1 Experimental	30
3.2 Métodos de investigación	30
3.2.1 Inductivo	30
3.2.2 Deductivo.....	30
3.2.3 Observación científica	30
3.2.4 Muestras.....	31
3.3 Fuentes de recopilación de información	31
3.3.1 Fuentes secundarias	31
3.3.2 Fuentes primarias.....	31
3.3.3 Instrumento de investigación.....	31
3.3.4 Material virtual	32
3.4 Procesamiento y análisis de la información.....	32
3.4.1 Aislamiento de las cepas microbianas	32
3.4.2 Clasificación microbiana en diferentes concentraciones de contaminantes.	32
3.4.3 Identificación de los microorganismos aislados	33
3.4.4 Caracterización morfológica.....	34
3.4.5 Análisis de clúster para los caracteres morfológicos y genéticos.....	34
3.4.6 Prueba de catalasa.....	35
3.4.7 Prueba de proteasa.	36
3.4.8 Tinción Gram.....	36
3.4.9 Caracterización molecular.	36
3.4.10 Selección de cepa microbiana con capacidad degradadora de pesticidas.....	37
3.4.11 Velocidad de crecimiento en medios contaminados.....	38
3.4.12 Degradación de pesticidas.	38
3.4.13 Diseño de la Investigación.....	39
3.4.14 Diseño para la evaluación in-vitro de ensayos (degradación de cipermetrina).	40
3.4.15 Diseño para la evaluación in-vitro de ensayos (degradación de clorpirifos).....	40
3.4.16 Diseño para la evaluación in-vitro de ensayos (degradación de glifosato).	41
CAPITULO IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 ANALIZAR EL CONSORCIO MICROBIANO DE LA CAMA BIOLÓGICA (BIODEP) PROVENIENTE DE LA FINCA LA MARÍA, UTEQ.....	43
4.1.1 Selección de cepas descomponedoras de pesticidas	43
4.2 Prueba de catalasa.....	44
4.3 Distribución morfológica.....	45
4.3.1 Selección de microorganismos con capacidad descomponedora de pesticidas.....	48
4.4 Desarrollo de microorganismos en medios contaminados con pesticidas.....	49
4.5 Seleccionar microorganismos de adaptación en medios minerales	50
4.6 Velocidad de crecimiento.	50
4.7 Caracterización morfo química.....	55
4.8 Discusión	57

CAPITULO V	60
5.1 Conclusiones.....	61
5.2 Recomendaciones	62
Bibliografía.....	63
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Localización	2
Figura 2. Aislamiento de microorganismos descomponedores de pesticidas	43
Figura 3. Prueba de catalasa	44
Figura 4. Relación filogenética de aislados	45
Figura 5. Perfiles electroforéticos.....	46
Figura 6. Relación filogenética.....	47
Figura 7. Desarrollo de microorganismos en medios contaminados.....	49
Figura 8. Velocidad de crecimiento bacteriano	51
Figura 9. Espectrofotometría Degradación de Cipermetrina.....	52
Figura 10. Espectrofotometría Degradación de Clorpirifo	53
Figura 11. Espectrofotometría Degradación de glifosato	54
Figura 12. Caracteres morfológicos coloniales.	56
Figura 13. Tinción de GRAM.	56

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza Velocidad de Crecimiento	39
Tabla 2. Esquema del Análisis de Varianza Degradación cipermetrina.....	40
Tabla 3. Esquema del Análisis de Varianza Degradación clorpirifos	40
Tabla 4. Esquema del Análisis de Varianza Degradación glifosato.....	41
Tabla 5. Clasificación microbiana en diferentes concentraciones de contaminantes.....	48
Tabla 6. Caracteres morfológicos y bioquímicos.	55

INTRODUCCIÓN

Los pesticidas, son sustancias destinadas a combatir plagas o pestes. Surgieron por la necesidad de manejar poblaciones de organismos nocivos para la sanidad humana, la de cultivos o frutos almacenados y la de animales domésticos. En realidad, el término *plaga* tiene una connotación antropocéntrica ya que, consideradas objetivamente, las plagas son simplemente poblaciones integrantes de un ecosistema (Bedmar, 2011).

A partir de la Revolución Industrial, se observó un crecimiento de las zonas urbanas con una dependencia de las rurales para la obtención de los alimentos, lo cual requería de una mayor producción, almacenamiento y protección de los mismos. En consecuencia, hubo un incremento sustancial de producción de sustancias químicas como parte del sostenimiento del desarrollo industrial y de la agricultura, por lo que la rama química lanzó al mercado sustancias de toxicidad inespecífica, pero de bajo costo (Asela, 2014).

A nivel mundial la producción de plaguicidas orgánicos sintéticos aumentó desde los inicios del siglo XX, debido al desarrollo de la industria petrolera. No obstante, la producción y uso de estos compuestos, así como de lubricantes, solventes, gasolinas u otros, han aumentado la carga de estas sustancias en la atmósfera, hidrósfera, suelos y sedimentos, lo que ha provocado episodios críticos de contaminación en el ambiente (Galán *et al.*, 2003).

Los plaguicidas, metales pesados y otras impurezas, son considerados por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, 1992) como contaminantes de acuíferos debido a su alta toxicidad, persistencia y movilidad, además de que afectan a importantes cargas hidráulicas, como lagunas y canales de irrigación; y por sus propiedades fisicoquímicas, son resistentes a la degradación biológica (Hirata, 2002).

El uso cotidiano de esos químicos contribuye a la crisis de la agricultura que dificulta la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales, y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores urbanos. La búsqueda de la productividad a corto plazo por encima de la sustentabilidad ecológica, practicada en las últimas décadas, ha dejado un saldo a nivel mundial de contaminación y envenenamiento donde el pretendido remedio universal ha resultado ser peor que la enfermedad (UNODC, 2010).

La biodegradación es el proceso natural por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas transformándolas en moléculas más pequeñas y no tóxicas. Sin embargo, este proceso es muy lento y puede acelerarse introduciendo determinadas bacterias o plantas en los ambientes contaminados. Esta intervención se denomina “biorremediación” o “biocorrección” y se define como el empleo de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes del suelo o del agua. En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de microorganismos, aunque algunos se basan en la introducción de cepas definidas de bacterias u hongos (ArgenBio, 2007).

El presente trabajo tiene como finalidad el aislamiento de microorganismos con capacidad de descomponer los pesticidas presentes en suelos contaminados, como una alternativa altamente eficiente que pretende mitigar los efectos causados por el mal uso de los pesticidas. Resultando como necesidad la caracterización de estos microorganismos para comprender su ciclo y modo de acción.

CAPÍTULO I.

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

La investigación se desarrolló en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Laboratorio de Microbiología que está situada en la ciudad de Quevedo provincia de Los Ríos, cuenta con una población de 150.827 habitantes, su actividad económica principal es la agropecuaria. Es la cabecera cantonal del cantón Quevedo y la ciudad más grande y poblada de la provincia de Los Ríos (INEC, 2006).



Figura 1. Localización de la ciudad de Quevedo con sus respectivas coordenadas

Quevedo se encuentra situado en el corazón del Litoral, por su posición geográfica y vial privilegiada ha beneficiado al país, además permite un intenso tráfico terrestre y fluvial. Posee un clima que beneficia para el cultivo. Es una población situada en las orillas del río Quevedo en el sector denominado "Las lomas". Se encuentra ubicada al 1° 20' 30" de Latitud Sur y los 79° 28' 30" de Longitud occidental, dentro de una zona subtropical (INEC, 2006).

1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA

En la producción agrícola, se emplea una gran cantidad de compuestos químicos para el manejo del cultivo, dichos compuestos tienen la capacidad de contaminar el suelo afectando la microfauna que mantiene en equilibrio el ecosistema. Las alteraciones en la microfauna del suelo tienen como efecto los cambios en los parámetros físicos químicos del mismo afectando la supervivencia y adaptabilidad de especies nativas.

En el Ecuador el mal empleo de estas sustancias y la baja regulación por parte de las entidades gubernamentales contribuyen a que los efectos de los químicos usados como pesticidas desplacen a especies nativas como lo son las especies acuáticas, estos compuestos poseen una alta solubilidad en el agua y su efecto en especies acuáticas resulta nocivo.

En el proceso de la cadena alimenticia el hombre resulta afectado por las contaminaciones por pesticidas en el agua, las especies acuáticas como peces son consumidos de forma frecuente por los habitantes que residen cerca de las zonas fluviales.

Los compuestos que se pierden por lixiviación contaminan las aguas subterráneas, teniendo como consecuencia daños a la piel y a la salud humana, con el avance de la industrialización existe una mayor exigencia de materia prima y un aumento en la producción de la misma, esto demanda un mayor empleo de pesticidas para mejorar los niveles de producción.

Las medidas de remediación de suelos y aguas contaminadas por pesticidas resultan poco accesibles y costosas, por lo que se requiere una alternativa que cumpla con todos los parámetros de calidad y reduzca en gran porcentaje la contaminación. El empleo de microorganismos es una medida que ha demostrado grandes resultados, pero el poco estudio de los mismos imposibilita su uso en la actualidad.

Las investigaciones en Ecuador en relación a microorganismos descomponedores de sustancias tóxicas son reducidas por lo que se desconoce su mecanismo de acción y adaptabilidad al medio.

1.3 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.3.1 Problema general

¿Cuál es el efecto de estos microorganismos en la descomposición de las sustancias tóxicas de los pesticidas?

1.3.2 Problemas derivados

- ¿Cómo se aíslan e identifican las cepas microbianas con capacidad para biodegradar pesticidas?
- ¿Qué medios de cultivo se emplean para la selección de estos microorganismos?
- ¿La degradación de los compuestos químicos a nivel invitro será igual a nivel invivo?

1.4 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

- **Campo:** Ciencias ambientales
- **Área:** Microbiología del suelo
- **Línea de investigación:** Desarrollo de soluciones tecnológicas para la gestión de residuos y promoción de energías alternativas.
- **Aspecto:** contaminación de suelos con pesticidas.
- **Tiempo:** 6 meses.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 General

Evaluar la capacidad biorremediadora del consorcio microbiano de cama biológica (Biodep) en pesticidas, *Piretroide* (cipermetrina), *Organosfoforado* (clorpirifos) y *N-fosfonometil glicina* (glifosato).

1.5.2 Específicos

- Analizar el consorcio microbiano de la cama biológica (Biodep) proveniente de la Finca La María, UTEQ.
- Seleccionar microorganismos de adaptación, en medios minerales constituidos con el 10 % de piretroide (cipermetrina), organosfoforado (clorpirifos) y N (fosfonometil) glicina (glifosato).
- Caracterizar microorganismos en base a relación morfológica y bioquímica de capacidad degradadora de pesticidas.

1.6 JUSTIFICACIÓN

La continua necesidad de producir más alimentos es el origen del aumento de la demanda de estos productos. Los datos disponibles ponen de relieve que en los últimos años se ha

producido un incremento de pesticidas del 4-5 % anual e incluso superior en los países desarrollados.

Los efectos de los pesticidas están directamente relacionados con la resistencia genética, las alteraciones que producen en el ecosistema, su acumulación en la cadena trófica y finalmente sobre el ser humano.

Sin embargo, también es cierto, que el uso de los pesticidas no está exento de problemas. Estos productos químicos se preparan deliberadamente para ser tóxicos frente a determinados organismos, siendo esta la razón de su utilidad comercial. No obstante, en numerosas ocasiones su empleo produce efectos muy negativos en los seres vivos, tanto en humanos como en animales.

Desde hace muchos años los hombres han utilizado distintos tipos de sustancias llamadas insecticidas de la primera generación tales como cenizas, azufre, compuestos arsenicales, tabaco molido, cianuro de hidrógeno, compuestos de mercurio, zinc y plomo, etc. para luchar contra los insectos. Éstos son productos en general muy tóxicos, poco efectivos en la lucha contra la plaga y muy persistentes en el ambiente (hasta 50 años), hoy día se usan muy poco e incluso bastantes de ellos están prohibidos por su excesiva toxicidad.

Un problema relacionado con el empleo de pesticidas es la llamada resistencia genética, la cual se produce porque entre los muchos individuos que componen la población de una plaga algunos poseen genes que hacen que el pesticida no sea tóxico para ellos por lo que soportan la acción del pesticida sin morir. Por otra parte, las nuevas poblaciones de la plaga heredan el gen de resistencia y la acción del pesticida contra ellas será mucho menor.

Uno de los principales problemas asociados al uso de pesticidas es el que éstos no sólo maten a la plaga, sino también a otros insectos beneficiosos como abejas y otros organismos. De esta forma pueden hacer desaparecer a los enemigos naturales de la plaga o provocar que estos se trasladen a otros lugares porque ya no encuentran alimento en ese campo y, después de un breve periodo, la población de la plaga rebrota y además en mayor cantidad que antes al no tener enemigos naturales

Algunos pesticidas tienen estructuras químicas muy estables y tardan años en degradarse en formas menos tóxicas. En las zonas en las que su empleo es continuo su concentración aumenta con el tiempo. En muchos casos estos productos son, además, difíciles de eliminar por los organismos vivos por ser poco solubles en agua y tender a acumularse en los tejidos grasos. Cuando los organismos vivos que se han contaminado con los pesticidas son ingeridos por otros, el producto contaminante se va acumulando en mayores proporciones en los tramos finales de la cadena trófica.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Medio de Cultivo

El cultivo de microorganismos es una actividad que requiere del conocimiento de técnicas de siembra o inoculación y de aislamiento para transferirlos de un medio a otro, o mantener su crecimiento y actividad. Es indispensable para realizar diversos estudios morfológicos, de identificación, bioquímicos, de patogenicidad y ecológico. (Aquiahuatl, 2012).

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias (López, 2016)

2.1.1 Microorganismos

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre. Los microorganismos son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta (Montaño, 2010).

2.1.2 Identificación microbiana

Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo. Estas técnicas se utilizan en diferentes áreas (Vizcarrondo, 2008).

- En el área clínica donde es de capital importancia conocer cuál es el agente causal de la infección que presenta un paciente, de manera de poder tratarlo con agentes terapéuticos.
- En la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos donde las normas de control de calidad exigen la ausencia de ciertos microorganismos.
- En investigación básica donde se aísla un determinado microorganismo que debe identificarse para comprobar si se trata de un microorganismo conocido o de uno nuevo para poder clasificarlo.

2.1.3 Bacteria

Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las bacterias son células procariotas, por lo que, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y esta se compone de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles (Woese, 1990).

2.1.4 Hongos

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas.

Los hongos son organismos eucariotas típicos y poseen un núcleo que contiene varios cromosomas (siete en *Candida albicans*, ocho en *Aspergillus nidulans* y dieciséis en *Saccharomyces cerevisiae*) delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80 S. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular (Aristegui, 2002).

2.1.5 Biodep

Hace algunos años se ha investigado la disminución en el impacto ambiental de estos derrames de plaguicidas al utilizar los sistemas llamados “camas biológicas”. Se ha documentado la degradación de distintos plaguicidas en estos sistemas incluyendo diversos herbicidas, insecticidas y fungicidas. Algunos estudios han logrado monitorear el comportamiento de estos sistemas durante varios años (Torstensson, 1997).

La degradación de los plaguicidas en el suelo implica diferentes procesos, además de los procesos de degradación biológica también se desarrollan fenómenos de degradación abióticos, como procesos de hidrólisis, oxidación, reducción e isomerización, que en conjunto ayudan a la degradación de los plaguicidas (McBride, 2000).

2.1.6 Plaguicidas

Los plaguicidas son compuestos químicos que sirven para combatir los parásitos de los cultivos, del ganado, de los animales domésticos y del hombre y su ambiente. De acuerdo con su actividad biológica pueden clasificarse en insecticidas, fungicidas, herbicidas y

rodenticidas según que su toxicidad sea para insectos, hongos, malas hierbas o roedores. También existen los atrayentes, repelentes y esterilizantes de insectos que coadyuvan a su destrucción por medio de estas acciones.

Según su naturaleza química, en principio, pueden clasificarse en inorgánicos y orgánicos. Los primeros no plantean, en general, una problemática importante desde el punto de vista de su toxicidad y evolución en el suelo. Por el contrario, en lo que se refiere a los orgánicos, se ha ido desarrollando una amplia gama de productos que plantea problemas de evolución en el complejo sistema del suelo (Sanchez, 2005).

Piretrinas:

Las piretrinas son compuestos naturales que tienen propiedades de insecticidas y que se encuentran en el extracto de piretro de ciertas flores de crisantemos. Las piretrinas se usan a menudo en insecticidas para uso doméstico y en productos para controlar insectos en animales domésticos o en el ganado. Los piretroides son sustancias químicas manufacturadas de estructura muy parecida a las piretrinas, aunque son generalmente más tóxicos para los insectos y también para los mamíferos, y permanecen más tiempo en el ambiente que las piretrinas. Se han desarrollado más de 1,000 piretroides sintéticos, pero menos de una docena se usan actualmente en los Estados Unidos (ATSDR, 2003).

Organofosforados:

Los compuestos organofosforados son un grupo de sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo y tienen un gran número de aplicaciones y utilidades. Han sido utilizados como aditivos del petróleo, disolventes, en las industrias de colorantes, barnices, cuero artificial, aislantes eléctricos, impermeabilizantes, ablandadores de plásticos,

fungicidas, insecticidas entre otros. Dado su amplia distribución y uso en diferentes industrias y en la agricultura, es muy frecuente que se presenten intoxicaciones accidentales por estos compuestos; además, como son sustancias que están al alcance de las personas, han sido empleadas como tóxicos en suicidios (Fernández, 2010).

Las intoxicaciones con compuestos organofosforados pueden generar tres cuadros clínicos: la intoxicación aguda, el síndrome intermedio y una neurotoxicidad tardía. El cuadro de intoxicación aguda genera un conjunto de signos y síntomas denominados *síndrome colinérgico* el cual se presenta como consecuencia de la excesiva estimulación de los receptores de acetilcolina, y que se caracteriza principalmente por cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular y excesiva actividad secretora. La aparición de este cuadro varía entre pocos minutos hasta doce horas posterior al contacto con el tóxico, dependiendo de la edad del paciente, la cantidad ingerida y la toxicidad intrínseca del organofosforado (Dirección Seccional de Salud de Antioquia, 2005).

N-(fosfonometil) glicina:

El glifosato (N-(fosfonometil) glicina) es el herbicida organofosforado de aplicación postemergente-sistémico y no selectivo- más importante y más ampliamente utilizado en todo el mundo. Su principal mecanismo de acción en plantas y varios microorganismos es inhibir la actividad de la 5-enolpiruvil shikimato- 3-fosfato sintetasa, una enzima de la vía metabólica del shikimato para la biosíntesis de corismato, precursor de una amplia variedad de metabolitos aromáticos de las plantas. El glifosato provoca de esta manera la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos, la reducción de la síntesis de proteínas y otras moléculas que en última instancia llevan a la planta a una muerte celular prematura (Vera, 2011).

Bioremediación:

Las prácticas de biorremediación consisten principalmente en el uso de diferentes organismos del medio para neutralizar sustancias tóxicas, bien transformándolas en sustancias de carácter menos tóxico o bien convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Una de las medidas biocorrectoras más empleada es la utilización de microorganismos para la descontaminación de suelos. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por parte de dichos microorganismos, los cuales las utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y de energía para sus funciones metabólicas (Torres, 2003).

2.1.7 Microorganismos bioremediadores

Pseudomonas:

Las *Pseudomonas* son un grupo grande e importante de bacterias Gram-negativo. Son encontradas como saprofitas de vida independiente en suelos, ecosistemas marinos, otros materiales naturales, y relacionados con plantas y animales como agentes desintegradores. También sobreviven y se multiplican en ambientes húmedos, en agua destilada, drenajes de lavabos, superficies mojadas, charcos y nebulizadores; agua estancada en general (Palleroni, 2006).

Las *Pseudomonas* son bacterias productoras de biosurfactantes como los ramnolipidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados, Bushnell y Hass fueron de los primeros en describir bacterias productoras de biosurfactantes, como el *Corynebacterium simplex* y cepas de *Pseudomonas* (Flavio, 2008).

Hongos de pudrición blanca:

Los hongos de pudrición blanco o HBP han desarrollado un sistema enzimático extracelular único y no específico, que permite la degradación total de los componentes químicos y estructurales de la madera. Tienen la capacidad de sintetizar enzimas como la casa, el manganeso peroxidasa y la lignina peroxidasa (LiP). Otras enzimas implicadas en este proceso son las del tipo oxidasas, como la arilalcohol oxidasa y la glioxal oxidasa, que generan H₂O₂ (Davila, 2006).

2.1.8 Consorcio Microbiano

Grupo de diferentes especies de microorganismos que actúan conjuntamente como una comunidad, para la degradación de distintos compuestos (Jáuregui & Chavez, 2006).

2.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.2.1 Biodegradación del malatión utilizando microorganismos nativos.

El estudio permitió demostrar la degradación de compuestos como el malatión presente en el suelo. En campo se realizó en un suelo de una zona destinada a la ganadería de leche y al cultivo de hortalizas, localizada en el municipio de Caldas, al sur del valle de Aburrá, Antioquia, Colombia. Se cuantificó la desaparición del malatión y la formación del principal metabolito, el malaoxón, para lo cual se validó un método analítico, que incluyó la extracción del suelo y la cuantificación del plaguicida y metabolito por cromatografía de gases. La extracción se realizó por agitación mecánica rotativa usando acetato de etilo, y la cuantificación se hizo en un cromatógrafo HP 6890 plus, acoplado a un detector de

microcaptura de electrones con inyector automático, obteniéndose recuperaciones en promedio de 89.4% para el malatión y de 93.8% para el malaoxón. En el período de experimentación de 35 días, la degradación del malatión en el laboratorio fue en promedio de 81.6% para la mayor concentración utilizada (2.50 µg/g de suelo), con respecto a la dosis inicial aplicada. De este valor, el 51.3% corresponde a la degradación microbiana y el restante a procesos abióticos. En condiciones de campo durante 21 días, se obtuvo una degradación en promedio de 74.8% con la dosis utilizada (1.50 µg/g de suelo). También se realizó el recuento de microorganismos del suelo determinándose en promedio 6.8×10^5 UFC/g suelo (Mosquera, 2009).

2.2.2 Degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo.

Se evaluó la degradación del insecticida clorpirifos en muestras de suelo durante 21 días, utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. En los ensayos se obtuvieron porcentajes de degradación, en promedio, para las muestras con hongo, de 96,3, 82,4 y 62,2% cuando se trabajaron, respectivamente, con concentraciones iniciales de clorpirifos de 0,95, 5,3 y 9,4 µg/g. Igualmente, los porcentajes de degradación estuvieron acompañados del aumento en la velocidad de degradación, cuando se partió de la concentración inicial de 0,95 µg/g (Lopera, Peñuela, Domínguez, & Mejía, 2004).

2.2.3 Degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas.

El 1,1,1-tricloro-2,2'-bis (*p*-clorofenil) etano (DDT) ha sido usado desde la segunda guerra mundial para controlar enfermedades transmitidas por insectos en humanos y animales domésticos. El uso de estos insecticidas organoclorados se ha prohibido en la mayoría de los países, debido a su persistencia en el ambiente, susceptibilidad de biomagnificación y

potencial toxicidad a animales superiores. La biorremediación involucra el uso de microorganismos para degradar contaminantes orgánicos presentes en el ambiente, transformándolos en compuestos más simples y de menor peligrosidad, inclusive inocuos. Esta estrategia de descontaminación tiene bajos costos, una amplia aceptación pública y puede llevarse a cabo en el sitio. Comparado con otros métodos, la biorremediación es una forma más promisorio y menos costosa de eliminar los contaminantes presentes en suelos y agua. En suelo los compuestos bifenilos clorados como el DDT, pueden ser parcialmente biodegradados por un grupo de bacterias aerobias que cometabolizan el contaminante. La biodisponibilidad de los contaminantes puede ser mejorada, tratando los suelos en presencia de agentes movilizadores del contaminante como los surfactantes. En esta revisión se discuten las diferentes estrategias de biorremediación de suelo contaminado con DDT, incluyendo mecanismos y rutas de degradación. Se describe la aplicación de estas técnicas en suelo contaminado y se discute cuál es la mejor estrategia para remediación de DDT (Betancur et al, 2013).

2.2.4 Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos.

La creciente utilización de plaguicidas organofosforados en las prácticas en los últimos años ha generado de los problemas ambientales; estos compuestos tienden a bioacumularse a través de cadenas alimenticias que muestran altos niveles de toxicidad riesgo potencial para la salud de las especies expuestas a estas sustancias. En esta investigación se utilizaron el soxhlet y sólido micro-extracción en el espacio de cabeza (hs-spme) para la extracción de plaguicidas organofosforados en ganado agrícola suelos y leche bovina, respectivamente. La presencia de demeton-smethylsulfon se determinó a concentraciones entre 272,9 y 1793.3

ppm en tierras de cultivo y 12.9 ppm en leche de vaca. Nativo se aislaron bacterias del suelo mostrando una capacidad degradante de estos pesticidas, *Bacillus* sp y *Pantoea agglomerans*, que dieron resultados de degradación de 73,5% y 68,6%, respectivamente, en el concentración de clorpirifos, demostrando que estos microorganismos son una posible solución para mejorar los suelos contaminados por este clase de pesticidas (Marín & Jaramillo, Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina, 2015).

2.2.5 Evaluación del proceso de biorremediación de suelos contaminados con pesticidas.

Se evaluó el proceso de biorremediación de suelos del Sector Gatazo Zambrano, el cual fue enriquecido con dos pesticidas organofosforados utilizados para eliminar plagas de pulgón: profenofos y dianizon, escogidos en base a las encuestas realizadas a los pobladores del sector que pertenece al Cantón Colta. El suelo se sometió a dos tratamientos diferentes: Bocashi (Tratamiento A) y Bioestimulación (Tratamiento B). Y se llevó un registro de las variables control de temperatura (18-30°), pH (6-8), humedad (30-60%) para mantenerlas dentro del rango óptimo, con el fin de proporcionar las condiciones adecuadas para que los microorganismos se desarrollen. Para bocashi se utilizó como fuente de nutrientes, elementos naturales y orgánicos en función a la relación de C/N de 28:1, en tanto que para bioestimulación se recurrió a nutrientes inorgánicos, agregándolos en función a la relación C/N/P de 100/10/1, el proceso duró 50 días. Los resultados registrados mediante una observación directa aplicando como instrumento de investigación un inventario; obteniéndose que el Tratamiento A tuvo un porcentaje de degradación de 98,49% para dianizon y para 90,73% para profenofos, el Tratamiento B tuvo un porcentaje de degradación

de 99,84% para dianizon y para 93,34 % para profenofos, se concluye que el Tratamiento B presentó mayor eficiencia tanto para la degradación de profenofos y dianizon. Se optimizó el tratamiento B que fue el más eficaz comparando esta vez la influencia del nitrógeno en la degradación, por lo que se trabajó con relaciones de C/N/P de 100/20/1 y de 100/1/1, llevando un mayor control de las condiciones, se recomienda a la población la aplicación cualquiera de los dos tratamientos para la biorremediación de suelos contaminados con estos pesticidas como profenofos y dianizon (Romero & Echeverría, 2016).

2.2.6 Biorremediación de suelos contaminados por organoclorados.

La presente investigación evaluó el proceso de biorremediación de plaguicidas organoclorados en un suelo del aeródromo agrícola “El Picacho” del Departamento de Chinandega, Nicaragua, en el que se registran grandes concentraciones de toxafeno. Se empleó la técnica de bioestimulación en el proceso de biorremediación, utilizando biosólidos como fuente de nutrientes esenciales para los microorganismos. El diseño experimental constó de 2 bloques completamente aleatorizados, cada uno con 3 unidades experimentales, contemplando 6 microcosmos de suelo. A cada tratamiento se agregó diferentes proporciones de biosólido estableciendo relaciones suelo: biosólido de 71:29 y 77:23. Al finalizar los tratamientos se obtuvieron porcentajes de remediación entre 84% y 69% respectivamente. Esto evidencia la efectividad de los biosólidos como fuente de nutrientes para la estimulación metabólica de microorganismos autóctonos en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con toxafeno (Durán & Ladera, 2016).

2.2.7 Evaluación de la capacidad degradadora y biorremediación de bacterias.

La presente investigación trata sobre la evaluación de la capacidad degradadora y acción biorremediadora de bacterias presentes en suelos con residuos de pesticidas de la Florícola Pencaflor ubicada en el cantón Urcuquí, provincia de Imbabura. El estudio consistió en aislar bacterias nativas del suelo de un invernadero, donde se identificaron a las bacterias mediante pruebas bioquímicas, obteniendo como resultado: *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp. y *Arthrobacter* sp. Posteriormente, se procedió a realizar la experimentación en dos fases, escala laboratorio (fase líquida) y otra biorremediación ex situ por bioacumulación (fase sólida). En la fase de laboratorio, la degradación fue comprobada por medio de la experimentación de biorreactores donde se sembró la bacteria más el medio mineral y el pesticida. En la fase biorremediación ex situ por bioacumulación, el suelo fue esterilizado y secado; posteriormente se midió la humedad y fue agregado el mismo porcentaje de humedad perdida; la humedad comprende el medio mineral, la bacteria y el pesticida. La degradación del pesticida se verificó mediante el crecimiento bacteriano, pues su única fuente de carbono fueron los pesticidas empleados. Los 3 métodos de conteo fueron: Espectrofotómetro, Cámara de Neubauer y Unidades Formadoras de Colonias. Los resultados indicaron que el consorcio bacteriano mostró el mayor crecimiento bacteriano y la mayor capacidad de biorremediación, el pesticida con mayor facilidad de biodegradación fue el pesticida Cleaner compuesto por Cyhalofop Butyl como ingrediente activo, el método más eficaz de crecimiento bacteriano resultó ser el sólido y el mejor equipo de conteo el espectrofotómetro. Para comprobar la degradación del pesticida se realizó un análisis de cromatografía líquida y espectrofotometría del suelo tratado, dando como resultado la biodegradación de aproximadamente el 100% del pesticida, ya que no fue detectada la cantidad del mismo por su baja concentración (Pérez M. G., 2014).

2.2.8 Secuencias del consenso intergénico repetidor enterobacteriano (ERIC) en *Escherichia coli*: evolución e implicaciones para ERIC-PCR

Las secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC) son palíndromos imperfectos de 127 bp que se producen en copias múltiples en los genomas de bacterias entéricas y vibriones. Aquí investigamos la distribución de estos elementos en las secuencias completas del genoma de nueve cepas de *Escherichia coli* (incluidas las especies de *Shigella*). Hay una tendencia significativa para que las copias sean adyacentes a genes más altamente expresados. Existe una considerable variación entre las cepas con respecto a la presencia de un elemento en cualquier región intergénica particular, pero algunas copias parecen haberse conservado desde antes de la divergencia de *E. coli* y *Salmonella* entérica (Wilson & Sharp, 2006).

2.2.9 Funciones de los microorganismos en la naturaleza.

2.2.10 Bacterias degradadoras.

Funciones:

Las bacterias son imprescindibles para el reciclaje de los elementos, pues muchos pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de estas. Como ejemplo cabe citar la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, solamente la mitad de los filos conocidos de bacterias tienen especies que se pueden cultivar en el laboratorio (Rappé, 2003).

Estructura:

La célula bacteriana propiamente dicha está limitada por una estructura integrada, la envuelta celular, de complejidad variable. En la mayor parte de las células, la envuelta celular consta de pared celular y de membrana citoplasmática subyacente. La existencia de bacterias con

formas distintas a la esférica demuestra que esta estructura tiene la suficiente rigidez como para soportar la presión superficial y la presión interna de la célula. Algunas bacterias poseen una pared celular muy delgada, casi confundida con la membrana citoplasmática; otras en cambio presentan una tercera capa o membrana externa adosada a la pared celular (Gustavo, 2010).

Formas:

Las bacterias se presentan con una morfología definida que está determinada por su pared rígida. Se pueden presentar como esféricas, ovaladas, denominándose cocos. Si la forma es cilíndrica se denominan bacilos o bastones. Estos bastones pueden ser rectos, curvos o con forma de espiral, en este último caso les llamamos espirilos. Las células bacterianas pueden mantenerse unidas en grupos después de que se han dividido, pero conservando siempre la independencia una célula de otra. Cocos o bacilos pueden agruparse en cadenas, en el caso de los cocos, cuando se presentan así agrupados, se denominan estreptococos. También se pueden presentar como diplococos (Pírez, 2006).

Las bacterias que tienen forma esférica u ovoide se denominan **cocos**. Y si se tiñen de azul con el Gram, se les llama grampositivos. Cuando los cocos se agrupan en cadenas, se les denomina estreptococos y cuando lo hacen en racimos, se les llama estafilococos; también se pueden agrupar en pares que reciben el nombre de diplococos. Las bacterias en forma de bastón reciben el nombre de **bacilos**. Si al teñirlos con el Gram quedan de color rojo, se les denomina gramnegativos. Los bacilos curvados que presentan espirales se llaman **espirilos**, rígidos; algunas bacterias en espiral presentan formas fácilmente reconocibles, como las **espiroquetas**, semejantes a un tornillo o sacacorchos, flexibles. Las bacterias que carecen de pared celular tienen gran plasticidad (**micoplasmas**) y adoptan una variedad de formas.

Las bacterias esféricas tienen un tamaño promedio de 1 micrómetro de diámetro, mientras que los bacilos miden 1.5 de ancho por 6 micrómetros de largo (Molina, 2015).

2.2.11 Hongos descomponedores.

Funciones:

El papel de los hongos aparece predominantemente como degradación del material orgánico que anualmente viene concedido sobre el terreno de las florestas, particularmente por lo que concierne a la celulosa, componente principal de los tejidos vegetales y la madera. Es de notar que cada especie fúngica resulta capaz de sólo descomponer algunas plantas en función de la enzima de que están dotadas, según el grado de complejidad química de la sustancia atacada y según el condicionamiento ejercido por los factores ambientales. Las sustancias más simples, son aquellos que están presentes en el citoplasma, son los comienzos de ser atacada y digerida (azúcares solubles y aminoácidos), de las saprofitas. Azúcares, almidón, hemicelulosa y numerosas proteínas son atacadas fácilmente digeridas por varios microorganismos (Rey, 2007).

Estructuras:

- **Micelio:** es el conjunto de filamentos y un trozo del mismo se denomina hifa. Las hifas pueden presentar septos y entonces el micelio está tabicado. Septos primarios son los formados cuando hay división nuclear y adventicia los otros. Si los tabiques están ausentes se habla de micelio continuo. Los mohos son micromicetos filamentosos. Cuando el hongo es una célula aislada se dice unicelular o levadura. Los cortos filamentos compuestos por las células que brotan de una levadura constituyen el pseudomicelio (Carrillo, 2003).

- Espora: En biología designa un cuerpo microscópico unicelular o pluricelular que se forma con fines de dispersión y supervivencia por largo tiempo (dormancia) en condiciones adversas, y que generalmente es una célula haploide. En muchos seres eucariotas es parte fundamental de su reproducción, originándose un nuevo organismo al dividirse por mitosis (especialmente en hongos) o meiosis (plantas) sin tener que fusionarse con otra célula; mientras que en algunas bacterias se trata en cambio de una etapa inactiva, resistente a la desecación y con fines de supervivencia no reproductivos (Universal, 2000).

2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL

2.3.1 Ley de Gestión Ambiental

La Ley de Gestión Ambiental constituye el cuerpo legal específico más importante atinente a la protección ambiental en el país. Esta ley está relacionada directamente con la prevención, control y sanción a las actividades contaminantes a los recursos naturales y establece las directrices de política ambiental, así como determina las obligaciones, niveles de participación de los sectores público y privado en la gestión ambiental y señala los límites permisibles, controles y sanciones dentro de este campo.

La promulgación de la Ley de Gestión Ambiental en el año de 1999, confirmó que el Ministerio del Ambiente, creado en el año de 1996, es la autoridad nacional ambiental y estableció un Marco general para el desarrollo y aprobación de la normativa ambiental, dentro de los principios de desarrollo sustentable, establecidos en la Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, y ratificados en la Constitución Política de la República.

2.3.2 Constitución Política del Ecuador (2008)

El Capítulo VII de los Derechos de la Naturaleza.

Art. 72.- La naturaleza tiene derecho a la restauración. Esta restauración será independiente de la obligación que tienen el Estado y las personas naturales o jurídicas de Indemnizar a los individuos y colectivos que dependan de los sistemas naturales afectados. En los casos de impacto ambiental grave o permanente, incluidos los ocasionados por la explotación de los recursos naturales no renovables, el Estado establecerá los mecanismos más eficaces para alcanzar la restauración, y adoptará las medidas adecuadas para eliminar o mitigar las consecuencias ambientales nocivas.

El Título I Ámbito y principios de la Gestión Ambiental.

Art. 1.- La presente Ley establece los principios y directrices de política ambiental; determina las obligaciones, responsabilidades, niveles de participación de los sectores público y privado en la gestión ambiental y señala los límites permisibles, controles y sanciones en esta materia.

El Capítulo II de la Evaluación de Impacto Ambiental y del Control Ambiental

señala:

Art. 21.- Los sistemas de manejo ambiental incluirán estudios de línea base; evaluación del impacto ambiental; evaluación de riesgos; planes de manejo; planes de manejo de riesgo; sistemas de monitoreo; planes de contingencia y mitigación; auditorías ambientales y planes de abandono. Una vez cumplidos estos requisitos y de conformidad con la calificación de los mismos, el Ministerio del ramo podrá otorgar o negar la licencia correspondiente.

El Capítulo IV de la capacitación y difusión.

Art. 31.- El Sistema Descentralizado de Gestión Ambiental, a través de los medios de difusión de que dispone el Estado proporcionará a la sociedad los lineamientos y orientaciones sobre el manejo y protección del medio ambiente y de los recursos naturales.

El Título V de la Información y Vigilancia Ambiental

Art. 40.- Toda persona natural o jurídica que, en el curso de sus actividades empresariales o industriales estableciere que las mismas pueden producir o están produciendo daños ambientales a los ecosistemas, está obligada a informar sobre ello al Ministerio del ramo o a las instituciones del régimen seccional autónomo. La información se presentará a la brevedad posible y las autoridades competentes deberán adoptar las medidas necesarias para solucionar los problemas detectados. En caso de incumplimiento de la presente disposición, el infractor será sancionado con una multa de veinte a doscientos salarios mínimos vitales generales.

2.3.3 Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria.

Parágrafo II del Suelo

Art. 212 Calidad de Suelos. - Para realizar una adecuada caracterización de este componente en los estudios ambientales, así como un adecuado control, se deberán realizar muestreos y monitoreos siguiendo las metodologías establecidas en el Anexo II y demás normativa correspondiente.

La Autoridad Ambiental Competente y las entidades del Sistema Nacional Descentralizado de Gestión Ambiental, en el marco de sus competencias, realizarán el control de la calidad del suelo de conformidad con las normas técnicas expedidas para el efecto. Constituyen normas de calidad del suelo, características físico-químicas y biológicas que establecen la composición del suelo y lo hacen aceptable para garantizar el equilibrio ecológico, la salud y el bienestar de la población.

Art. 213 Tratamiento de Suelos Contaminados. - Se lo ejecuta por medio de procedimientos validados por la Autoridad Ambiental Competente y acorde a la norma técnica de suelos, de desechos peligrosos y demás normativa aplicable. Los sitios de disposición temporal de suelos contaminados deberán tener medidas preventivas eficientes para evitar la dispersión de los contaminantes al ambiente.

Art. 409.- Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión.

En áreas afectadas por procesos de degradación y desertificación, el Estado desarrollará y estimulará proyectos de forestación, reforestación y revegetación que eviten el monocultivo y utilicen, de manera preferente, especies nativas y adaptadas a la zona.

CAPÍTULO III.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

3.1.1 Experimental

El estudio posee las cualidades de una investigación de tipo experimental científica, puesto que se realizó la manipulación directa de las variables en estudio: tipo de microorganismos y suelo contaminado con pesticidas, a través del análisis en laboratorio se procedió a la identificación de los microorganismos y clasificación de los mismos, empleando todos los estándares nacionales e internacionales que rigen la microbiología del suelo y del medio ambiente.

3.2 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

3.2.1 Inductivo

Se utilizó durante el proceso de aislamiento, identificación y selección de los microorganismos presentes en las camas biológicas con capacidad degradadora de pesticidas.

3.2.2 Deductivo

Permitió evaluar el nivel de degradación y fragmentación a través del empleo de los microorganismos aislados en condiciones de laboratorio.

3.2.3 Observación científica

Se usó durante todo el proceso de la investigación, realizando un diagnóstico de los procesos para conocer la realidad mediante la percepción directa de los objetos y fenómenos.

3.2.4 Muestras

Las muestras fueron tomadas en la Finca Experimental la María ubicada en Mocache los Ríos Ecuador, estas muestras se almacenaron en condiciones óptimas para no afectar los parámetros que pudieran interferir en los procesos de aislamiento y selección de microorganismos.

3.3 FUENTES DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

3.3.1 Fuentes secundarias

En las **fuentes o informaciones secundarias** se empleó enciclopedias, antologías, directorios, libros o artículos que interpretaron otros trabajos que validaron todos los procesos de la investigación, como el aislamiento de los microorganismos y la fase de crecimiento en medios de cultivo selectivos.

3.3.2 Fuentes primarias

En las fuentes primarias se usó libros, revistas científicas y de entretenimiento, periódicos, diarios, documentos oficiales de instituciones públicas, informes técnicos y de investigación de instituciones públicas o privadas, patentes, normas técnicas que optimizaron los recursos de la investigación y trataron en lo posible reducir los riesgos dentro del área de trabajo.

3.3.3 Instrumento de investigación

3.3.3.1 Ficha de laboratorio

En la misma se recolectó toda la información relativa al análisis microbiológico en el laboratorio: número de cepas aisladas, porcentaje de pesticidas descompuestos, crecimiento

microbiano, tipo de microorganismo, cinética de crecimiento, alteraciones en los medios de cultivo entre otros aspectos básicos de la investigación.

3.3.3.2 Ficha de monitoreo

Sirvió para el registro de la información relativa al monitoreo de los procesos de la investigación donde se evaluarán: número de muestras, peso de las muestras, transporte y tiempo de almacenamiento de muestras, y demás aspectos relativos al monitoreo del suelo y el desarrollo de los microorganismos.

3.3.4 Material virtual

Se usó plataformas virtuales para el procesamiento de los datos y obtención de resultados.

3.4 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

3.4.1 Aislamiento de las cepas microbianas

Para la selección de cepas microbianas, se evaluó el crecimiento de todas las cepas en un medio mineral estéril cuya única fuente de carbón fue el pesticida. Se evaluaron a una concentración de los diferentes pesticidas a 300ppm. La composición del medio es: 20g/L de agar-agar, 0.007 g/L de NaCl, 0.004g de CaCl₂·2H₂O, 0.002 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0.028g/L de K₂HPO₄, 0.028 g/L de KH₂PO₄, Se realizó siembra en placa por aislamiento para bacterias, por triplicado. Se incubó a una temperatura de 30°C con pH de 6.7 y se evaluó el crecimiento de forma cualitativa durante 8 días.

3.4.2 Clasificación microbiana en diferentes concentraciones de contaminantes.

Todas las muestras procedentes de la cama biológica se evaluaron para constatar su desarrollo en medios de cultivo contaminados con PESTICIDAS, *Piretroides*

(CIPERMETRINA), Organofosforados (*CLORPIRIFOS*) Y *N*-(fosfonometil) glicina (GLIFOSATO), en concentraciones de 0.01, 1.00, y 5% respectivamente el desarrollo en la más alta concentración de contaminante dio paso a la selección del microorganismo como posible degradador de pesticidas.

Los medios de cultivo para la separación de los microorganismos, se les adicionó fungicida para impedir el desarrollo de hongos y antibiótico de amplio espectro, que impidió el crecimiento de bacterias. De esta forma se logró identificar en primera instancia a que grupo pertenecían.

3.4.3 Identificación de los microorganismos aislados

Para la identificación de los microorganismos aislados se procedió la utilización de las técnicas básicas de microbiología, dentro de estas técnicas se empleó tinción de gram, así como también el uso de kits especializados para tal fin y la tinción con azul de tripan en el caso de hongos. Por medio de las características morfológicas que se presentaron se realizó la respectiva clasificación.

Mediante el empleo de medios selectivos se procedió a una identificación más específica y la separación de hongos y bacterias que se usaron en los tratamientos respectivos.

Una vez obtenidas y separadas las cepas de microorganismos se procedió a su respectiva siembra en medio mineral líquido donde se adicionó el pesticida respectivo cada 8 días en concentraciones de 200ppm.

Todos los materiales de laboratorio previo a su utilización se esterilizaron, empleando una autoclave a 125 grados centígrados durante 40 minutos.

3.4.4 Caracterización morfológica.

Los aislados obtenidos de cada tratamiento se sometieron a pruebas de caracterización morfológica haciendo uso de la técnica de la microgota, donde cada cepa se sembró de forma individual en medio de cultivo líquido, transcurridas 24 horas se realizó diluciones seriadas en relación 1-100, obteniendo un volumen final de 200 microlitros por dilución.

Cada dilución se sembró en placas que contenían 10 ml de medio de cultivo sólido, se dejó incubar por 24 horas hasta observar la formación de colonias separadas las cuales se tomaron como referencia la textura, color, elevación y forma.

Los datos obtenidos de la caracterización morfológica se la llevó a una tabla manejada con códigos binarios donde los valores correspondientes a 1 hace referencia a la presencia de dicha variable y los valores 0 denotas la ausencia de la misma.

3.4.5 Análisis de clúster para los caracteres morfológicos y genéticos.

3.4.5.1 Análisis al desarrollo del dendrograma por caracteres morfológicos.

Se procedió a la evaluación de los caracteres morfológicos de colonia: circular, puntiforme, irregular y fusiforme; borde de la colonia: entera, ondulado, lobulado y filamentoso; y elevación de la colonia: plana, convexa y elevada. También la emisión de fluorescencia y detección de Catalasa. Información fue remplazada por una matriz binaria de valores 1 y 0 (1= T, 0= A). La historia evolutiva se infirió empleando al método Neighbor-Joining , el árbol filogenético se construyó en base a los caracteres morfológicos empleando Maximum Composite Likelihood con el programa MEGA 6.06 (Tamura, et al., 2013)

3.4.5.2 Análisis al desarrollo del dendrograma por perfiles genéticos ERIC-PCR.

Para el agrupamiento genético mediante ERIC PCR se realizó un análisis de los perfiles de información binaria de (1 y 0) generados por los productos de amplificación. Información fue remplazada por una matriz binaria de valores 1 y 0 (1= T, 0= A).

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Maximum Likelihood basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-91.6660). El porcentaje de árboles en el que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron aplicando el método Neighbor-Joining a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque Maximum Composite Likelihood (MCL). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 9 secuencias de nucleótidos. Se realizaron análisis evolutivos con el programa MEGA 6.06 (Tamura, et al., 2013)

3.4.6 Prueba de catalasa.

Para realizar dicha prueba se procedió a la inoculación de los microorganismos en placas que contenían agar nutritivo incubadas a 28°C durante 24 horas, transcurrido el periodo de incubación se tomó una pequeña porción de la biomasa generada la cual se montó en un porta objeto donde se adicionó 3 microlitros de peróxido de hidrógeno para generar la reacción enzimática que desencadena la emisión de pequeñas burbujas en caso de ser positiva.

3.4.7 Prueba de proteasa.

Se realizó en agar gelatina en concentraciones y composición de: Cloruro de sodio 10 gramos por litro, peptona 5 gramos por litro, gelatina 5 gramos por litro y agar 15 gramos por litro, se esterilizó en autoclave por 30 minutos para texturizar y eliminar posibles contaminantes.

Las muestras bacterianas previamente crecidas se inocularon en el agar GELATINA, se incubaron por 48 horas a 25°C, y se observó la presencia de un halo inhibitorio que demostró la presencia de enzimática.

3.4.8 Tinción Gram.

Para el proceso de tinción se utilizó maza bacteriana con 24 horas de incubación en medio de cultivo sólido, se extendieron las 9 muestras de forma individual en porta objetos, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente para fijar las muestras con un mechero de alcohol, se agregó cristal violeta transcurrido un minuto las muestras se lavaron con agua eliminando los excesos del colorante. Se agregó lugol el cual se dejó actuar por un minuto luego se decoloró las muestras con cetona y se lavaron con agua para dar paso al colorante safranina que se dejó actuar por 1 minuto.

Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico verificando los contrastes obtenidos en cada bacteria.

3.4.9 Caracterización molecular.

Para corroborar los datos de caracterización morfológica se empleó técnicas moleculares denominadas REP-PCR que consistió en la extracción de ADN bacteriano haciendo uso del KIT DNA Extractor, obteniendo un volumen de 20 microlitros de ADN genómico.

Las muestras de ADN se sometieron a una PRC generalizada empleando los partidores universales ERIC-PCR. Las reacciones PCR con secuencias repetidas altamente conservadas se realizaron con los iniciadores ERIC1R (3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5'), ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), la reacción se llevó a un volumen final de 25 µL, que contenían 50 ng de ADN, 1 U de Taq ADN polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 mM de dNTPs y 0,1 µM de cada iniciador. El proceso de amplificación de los iniciadores ERIC consistió de 1 ciclo inicial de desnaturalización 95 °C por 6 min, 35 ciclos de desnaturalización con la siguiente secuencia: 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 65°C por 8 min, y un 1 ciclo final de extensión de 65°C por 16 min.

Las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis a 80 voltios por 2 horas en un gel de agarosa al 1,5% (P/V) teñido con bromuro de etidio al 0,1 µg mL⁻¹ y corrido a 80 V por 2.5 horas.

3.4.10 Selección de cepa microbiana con capacidad degradadora de pesticidas

Para la selección de la cepa microbiana se realizó el crecimiento de todos los microorganismos aislados en medio de cultivo mineral sólido con adición de 0.5 % de pesticida, se evaluó las dimensiones de desarrollo y adaptabilidad a los 2 y 6 días después de la inoculación en medio de cultivo.

1 mL de la biomasa se inoculó en frascos con 100 mL de caldo mineral con adición de pesticidas. El experimento fue realizado por triplicado. El caldo mineral con adición de pesticidas, sin bacteria fue utilizado como control.

Los frascos se colocaron en una incubadora con agitación orbital a 25°C y 150 rpm, bajo oscuridad. El crecimiento celular y la biodegradación de pesticidas fueron evaluados simultáneamente.

Para determinar el crecimiento celular, se tomaron muestras de 100 µL periódicamente del medio de cultivo y diluidas de forma seriada en cloruro de sodio al 0,85% hasta 10⁻⁴.

Las diluciones fueron sembradas por triplicado en placas de Petri con caldo mineral+ pesticida, las cuales se incubarán a 25°C durante 8 días, posteriormente se realizó los recuentos de UFC/mL.

3.4.11 Velocidad de crecimiento en medios contaminados.

Los microorganismos seleccionados en las pruebas de adaptación fueron sometidos de forma individual a medios de cultivo contaminados con los pesticidas, *Piretroides* (CIPERMETRINA), Organofosforados (*CLORPIRIFOS*) Y *N-(fosfometil) glicina* (GLIFOSATO) en una concentración de un 10% respectivamente, se evaluó el desarrollo cada 24 horas en relación al diámetro generado por la colonia.

Transcurridas las 72 horas de crecimiento se finalizó la toma de datos para su respectivo procesamiento, permitiendo así determinar la velocidad de crecimiento de cada microorganismo evaluado.

3.4.12 Degradación de pesticidas.

Se realizó un medio de cultivo mineral en concentración y composición de: Cloruro de sodio 20g/l, Cloruro de potasio 0,7g/l, Fosfato de Potasio 2g/l, Sulfato de Magnesio 1g/l, Fosfato di sódico 3 g/l, Nitrato de Amonio 1g/l, Agua 1000 ml. Al medio mineral se le agregó como única fuente de carbono los pesticidas *Piretroides* (CIPERMETRINA), Organofosforados

(CLORPIRIFOS) Y *N*-(fosfonometil) glicina (GLIFOSATO), en una concentración del 5% a cada tratamiento respectivamente.

Los datos de degradación se los midió por espectrofotometría, centrifugando la masa bacteriana a 8,000 revoluciones durante 1 minuto para evitar que se alteren los valores por la biomasa suspendida en el medio de cultivo. Cada tratamiento se evaluó cada 72 horas para verificar la descomposición por parte de las bacterias en la disminución de la absorbancia en relación al control que no contenía bacterias, generando valores diarios correspondientes a 1, 3, 6, 9, 12 y 15 días respectivamente

3.4.13 Diseño de la Investigación

Diseño para la velocidad de crecimiento

Se empleó un diseño completamente al azar DCA, para la velocidad de crecimiento del consorcio microbiano generando 9 cepas a evaluar cada una con 3 unidades experimentales realizando 3 repeticiones.

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza Velocidad de Crecimiento

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	26
Tratamientos	8
Total	34

Elaborado: Pablo Morrillo

3.4.14 Diseño para la evaluación in-vitro de ensayos (degradación de *cipermetrina*).

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, que evaluó el efecto del consorcio microbiano de 3 cepas adaptadas a concentraciones altas de cipermetrina, generando 5 tratamientos con 2 unidades experimentales cada uno y 3 repeticiones.

Tabla 2. Esquema del Análisis de Varianza Degradación cipermetrina

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	8
Tratamientos	2
Total	10

Elaborado: Pablo Morrillo

3.4.15 Diseño para la evaluación in-vitro de ensayos (degradación de *clorpirifos*).

Se usó un diseño completamente al azar DCA, que evaluó el efecto del consorcio microbiano de 3 cepas adaptadas a concentraciones altas de clorpirifos, generando 5 tratamientos con 2 unidades experimentales cada uno y 3 repeticiones.

Tabla 3. Esquema del Análisis de Varianza Degradación clorpirifos

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	8
Tratamientos	2
Total	10

Elaborado: Pablo Morrillo

3.4.16 Diseño para la evaluación in-vitro de ensayos (degradación de *glifosato*).

Se designó un diseño completamente al azar DCA, que evaluó el efecto del consorcio microbiano de 3 cepas adaptadas a concentraciones altas de glifosato, generando 5 tratamientos con 2 unidades experimentales cada uno y 3 repeticiones.

Tabla 4. Esquema del Análisis de Varianza Degradación glifosato

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	8
Tratamientos	2
Total	10

Elaborado: Pablo Morrillo

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CONSORCIO MICROBIANO DE LA CAMA BIOLÓGICA (BIODEP) PROVENIENTE DE LA FINCA LA MARÍA, UTEQ.

4.1.1 Selección de cepas descomponedoras de pesticidas

Se inició con la toma de muestras, procedentes de una cama biológica BIODÉP. Las cuales fueron procesadas y se logró obtener una gran cantidad de microorganismos tales como hongos y bacterias, que se sometieron a pruebas de crecimiento en placas, que contenían medio de cultivo contaminado con los pesticidas en una dosis baja, permitiendo así observar el desarrollo de las colonias microbianas adaptadas a las 48 horas después de la inoculación.

Las muestras estaban formadas por un consorcio microbiano en donde la prevalencia de bacterias superó a los hongos en A, las muestras sometidas a glifosato la prevalencia de bacterias se dio en un 60% en B, contaminante Cipermetrina, las bacterias superaron el desarrollo de los hongos en un 80% y en C, los hongos se desarrollaron en un 30% pero fue superado por la formación y presencia de bacteria como se muestra en la (Figura 2).

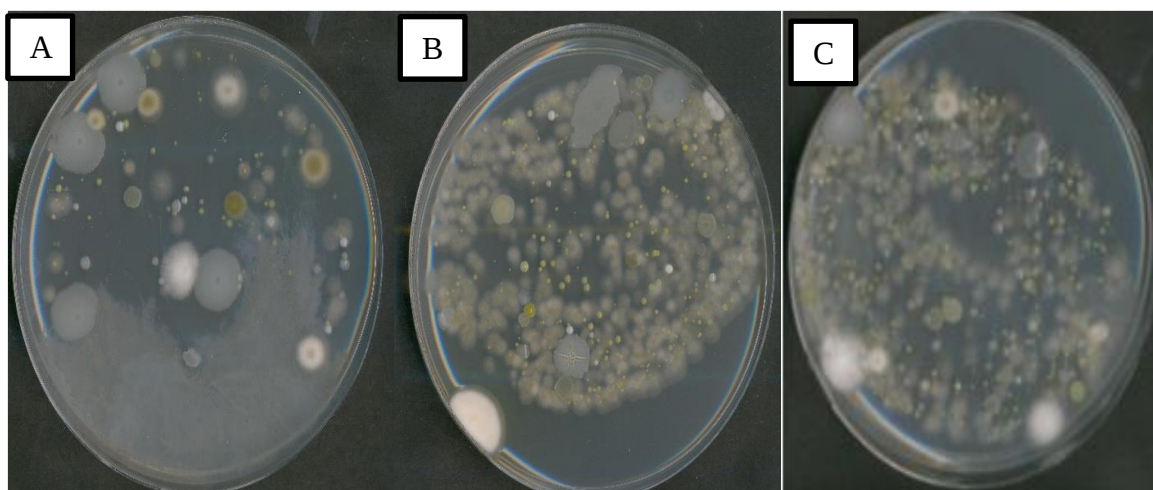


Figura 2. Aislamiento de microorganismos descomponedores de pesticidas. **A**, consorcio microbiano desarrollado en medio de cultivo contaminado con glifosato. **B**, consorcio microbiano desarrollado en medio de cultivo contaminado con Cipermetrina. **C**, consorcio microbiano desarrollado en medios de cultivo contaminado con Clorpirifó.

4.1.2 Prueba de catalasa.

El 44.4 % de las cepas evaluadas conformadas por **B, H, G, I** mostrado en la **figura 3**. Reacciono a positivamente a la prueba de catalasa. La producción de catalasa es un mecanismo de defensa frente a células fagocíticas, aunque su producción parece no ser esencial para el desarrollo de otros microorganismos.

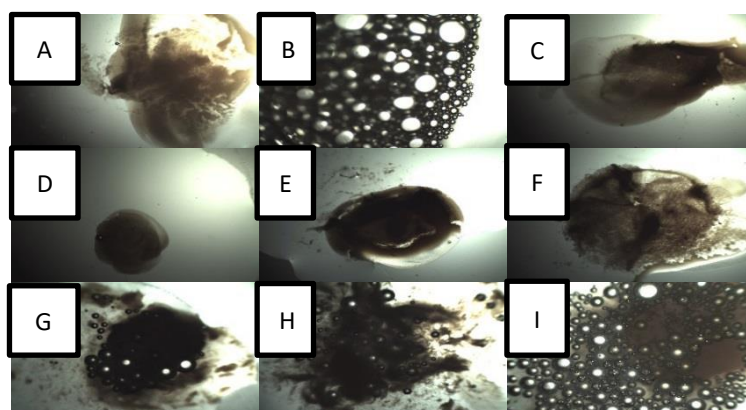


Figura 3. Prueba de catalasa., **A** CL1, **B** CL2, **C** CL3, cepas pertenecientes al grupo de Clorpirifos. **D** CP1, **E** CP2, **F** CP3, grupo Cipermetrina. **G** GL1, **H** GL2, **I** GL3, grupo Glifosato.

Las colonias de los aislados bacterianos estudiados presentaron morfologías muy diversas y tiempos de aparición diferentes. Las cepas CP1 CP2 Y CP3, originaron colonias de crecimiento lento (tiempo de aparición de las colonias 2-3 días respectivamente), de morfología muy similar El aislado CL1 Y CL3, a pesar de presentar crecimiento rápido se diferenció de los anteriores por formar colonias de aspecto translúcido y brillante de consistencia mucilaginosa, y el aislado CL2 con morfología muy distante al primer grupo y diferenciación en el color de la colonia, presentó crecimiento rápido.

4.1.3 Distribución morfológica.

La distancia evolutiva de los aislados en relación a sus caracteres morfoquímicos se separó en dos grupos primarios (**I y II**), como se muestra en la **figura 4**. El grupo **I** se subdivide en **A** conformado por las cepas (**CL1-CL3**) con un 75% de similitud y **B** conformado por (**CP2-CP3-CP2**) con un 40% de similitud respectivamente. El grupo **II** se subdivide en **C** conformado por las cepas (**GL1-GL2-GL3**) con una similitud de un 100% y **D** se encuentra la cepa (**CL2**) que no comparte similitud con ninguno de los aislados.

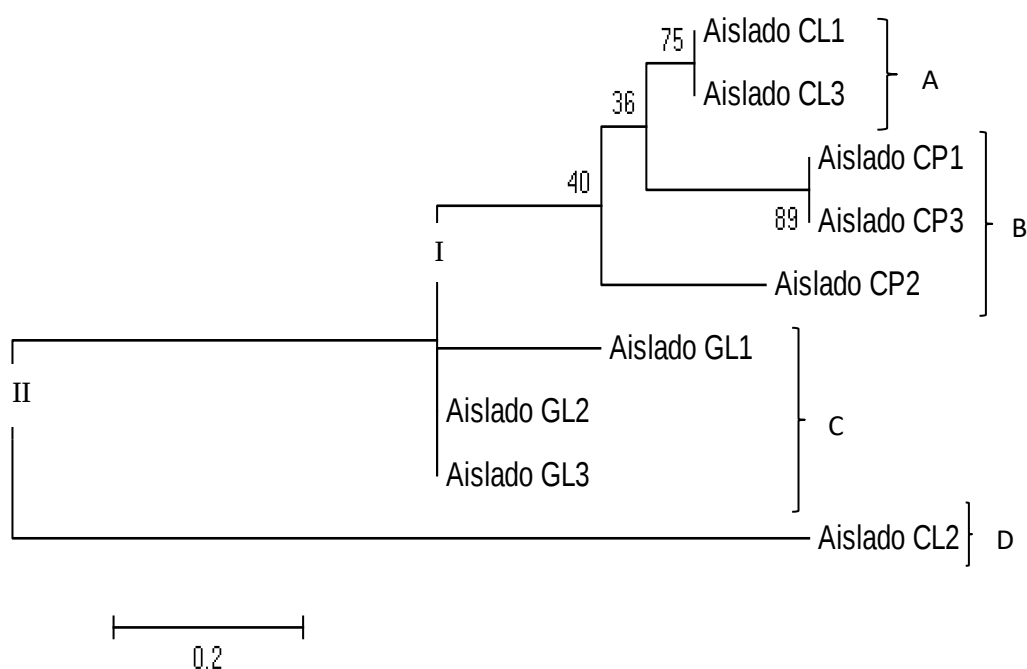


Figura 4. Relación filogenética de aislados asociados a degradación de pesticidas. Dendrograma construido con datos de caracteres morfológicos y bioquímicos de los aislados correspondientes a la degradación de *Piretroides* (CIPERMETRINA), Organofosforados (CLORPIRIFOS) Y *N*-(fosfometil) glicina (GLIFOSATO). La distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap.

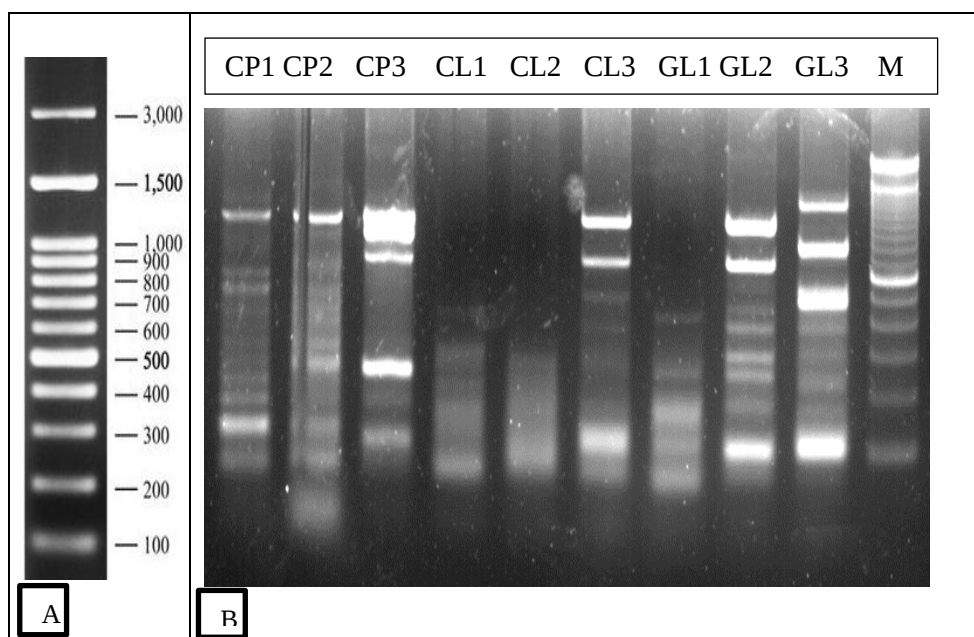


Figura 5. Perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR. A, **marcador de peso molecular.** B, **mapeo genómico de las cepas correspondientes a la degradación de PESTICIDAS, CP1, CP2, CP3, grupo correspondiente al tratamiento Cipermetrina. CL1, CL2, CL3, grupo Clorpirifo y GL1, GL, GL3, grupo Glifosato.**

Los fragmentos obtenidos por los partidores ERIC dan paso a la clasificación molecular de las 9 cepas evaluadas, generando códigos binarios conformados por uno y cero cada patrón en relación al peso molecular corresponde a un fragmento que se compara en cada cepa bacteriana que van desde los 100pb hasta los 1500pb.

Las cepas CL1, CL2 Y GL1 guardan relación genética en cuanto a la cantidad de fragmentos generados que van desde los 200pb hasta los 700pb aproximadamente.

6), en donde se clasifican 3 grupos (**I, II, III**). En el primer grupo se conformó por las cepas CP1 Y CL1 que comparten una gran similitud en los patrones generados, el segundo grupo se encuentran las cepas CL3, CL2 y GL3 que comparten las mismas características morfo químicas. En el último grupo conformado por las cepas CP3, CP2, GL2 y GL1 son bacterias Gram negativas con caracteres morfológicos idénticos.

4.2 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DESCOMPONEDORA DE PESTICIDAS.

Del grupo de microorganismos generados en la primera selección, se obtuvo una gran diversidad de los mismos, dando como resultado diferentes selecciones microbianas las cuales se sometieron a pruebas individuales de adaptación al medio de cultivo contaminado con los diferentes pesticidas como se destaca en (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación microbiana en diferentes concentraciones de contaminantes

	Antibiótico	Fungicida	0,01%	1%	5%
cp1	0	1	1	1	1
cp2	0	1	1	1	1
cp3	0	1	1	1	1
cp4	0	1	1	1	0
cp5	1	0	1	0	0
gl1	0	1	1	1	1
gl2	0	1	1	1	1
gl3	0	1	1	1	1
gl4	1	0	1	0	0
cl1	0	1	1	1	1
cl2	0	1	1	1	1
cl3	0	1	1	1	1
cl4	1	0	1	1	0
cl5	1	1	1	0	0
cl6	1	1	1	0	0

La adaptación de los medios de cultivo permitió separar y clasificar las bacterias y hongos, evaluando su capacidad de adaptarse a diferentes concentraciones de contaminación, en el

tratamiento de cipermetrina se destacó la presencia de un hongo (cp5), que no se desarrolló en las concentraciones altas del contaminante. Consecutivamente el tratamiento de glifosato generó adaptación de 3 tipos de bacterias en altas concentraciones de glifosato, dentro del tratamiento de clorpirifos existió la misma cantidad de hongos y bacterias donde la prevalencia y adaptación en el medio de cultivo contaminado fue por parte de las bacterias, de todos los microorganismos evaluados se tomaron los que se adaptaron y desarrollaron en la selección de 10% del contaminante.

4.2.1 Desarrollo de microorganismos en medios contaminados con pesticidas

El desarrollo de bacterias a las 48 horas después de la inoculación es abundante en los medios de cultivos contaminados con Cipermetrina, Clorpirifo y glifosato (A-B-C) respectivamente mientras que en D se pusieron a prueba los hongos que presentaron crecimiento en placas mostrando crecimiento lento o nulo.

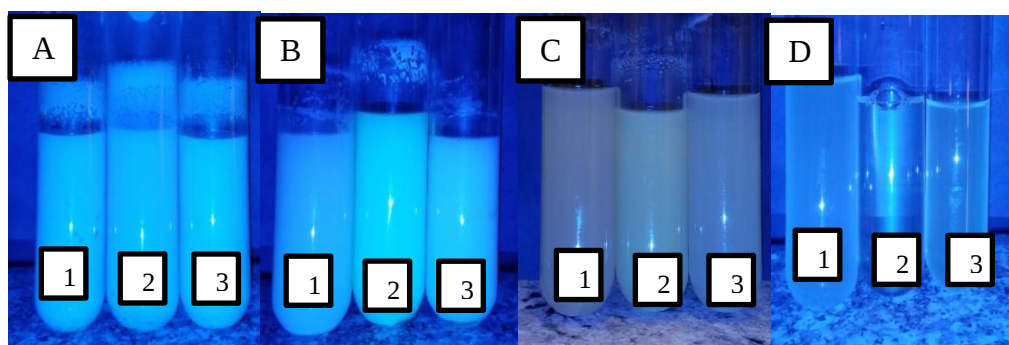


Figura 7. Desarrollo de microorganismos en medios contaminados. A, grupo perteneciente al apartado Cipermetrina A1, aislado CP1, A2, aislado CP2, A3, aislado CP3. B, grupo Clorpirifo, B1, aislado CL1, B2, aislado CL2, B3, aislado CL3. C, grupo glifosato, C1, aislado GL1, C2, aislado GL2, C3, aislado GL3. D, hongos procedentes de los apartados Cipermetrina, Clorpirifo y Glifosato, D1, aislado CP4, D2, aislado CL4, D3 aislado GL6.

Las bacterias del grupo A y B (Cipermetrina y Clorpirifo) respectivamente mostraron fluorescencia mientras que las bacterias que se desarrollaron en glifosato no emitieron fluorescencia, pero se desarrollaron de forma normal.

4.2.2 Seleccionar microorganismos de adaptación en medios minerales constituidos con el 10 % de piretroide (cipermetrina), organosforado (clorpirifos) y N (fosfonometil) glicina (glifosato).

La adaptación de los microorganismos a condiciones adversas altera sus funciones básicas, optimizando el uso de los recursos que los rodean como es el caso de fuentes de carbono alternas donde se encuentran los pesticidas *Piretroides*, Organofosforados y *N-(fosfonometil) glicina*. La velocidad de crecimiento en medios donde su única fuente de carbono es un contaminante demuestra un buen aprovechamiento del mismo, el crecimiento en este tipo de medios desencadena un sinnúmero de procesos metabólicos para la transformación de estas sustancias nocivas en sustancias orgánicas.

4.2.3 Velocidad de crecimiento.

Los resultados reflejan el desarrollo de las colonias de forma individual. El aumento de la colonia se reduce a la generación de masa que es el incremento o aumento de células bacterianas en relación al tiempo, la cepa **(CP1)**, correspondiente al tratamiento de Cipermetrina alcanzó un mayor desarrollo a las 48 y 72 con valores promedios de 8 y 17 mm respectivamente, como respuesta al aprovechamiento de la fuente de carbono proporcionada por el contaminante.

El incremento de la masa bacteriana es un indicativo de su capacidad para consumir los compuestos contaminantes, pero la acumulación de los productos de desecho y formación de otros compuestos en el proceso de descomposición conlleva a la muerte de las células bacterianas o reducción en su crecimiento.

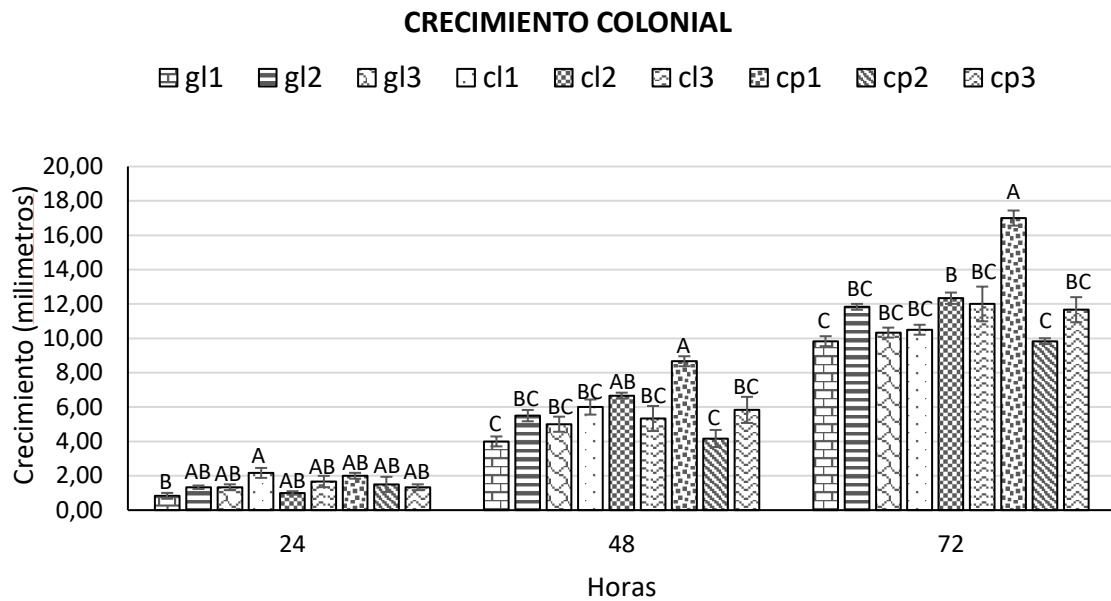


Figura 8. Velocidad de crecimiento bacteriano en medios contaminados. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las barras indican el crecimiento bacteriano correspondiente de cada tratamiento, mostrando resultados simultáneos a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación.

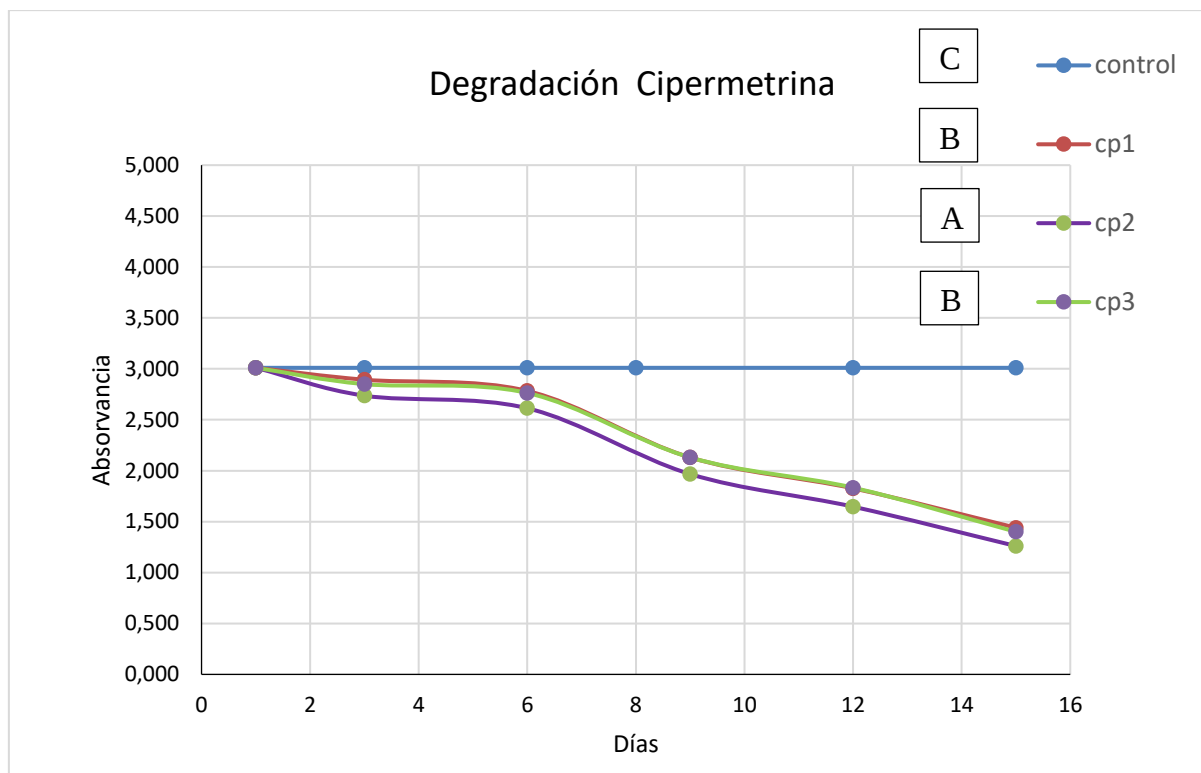


Figura 3. Espectrofotometría Degradación de Cipermetrina. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las líneas de tendencia de cada tratamiento muestran el progreso y disminución del compuesto contaminante, eje de las y muestra los valores de absorbancia y eje de las x proyección en días.

Las bacterias adaptadas a las exposiciones constantes de contaminantes emplean un mecanismo único de alimentación y aprovechamiento de los medios que las rodean como se refleja en la figura 9, donde los 3 aislados CP1, CP2 y CP3 con valores 1.44, 1.26 y 1.40 nanómetros respectivamente, lograron descomponer de forma eficiente el contaminante *Piretroides* (CIPERMETRINA).

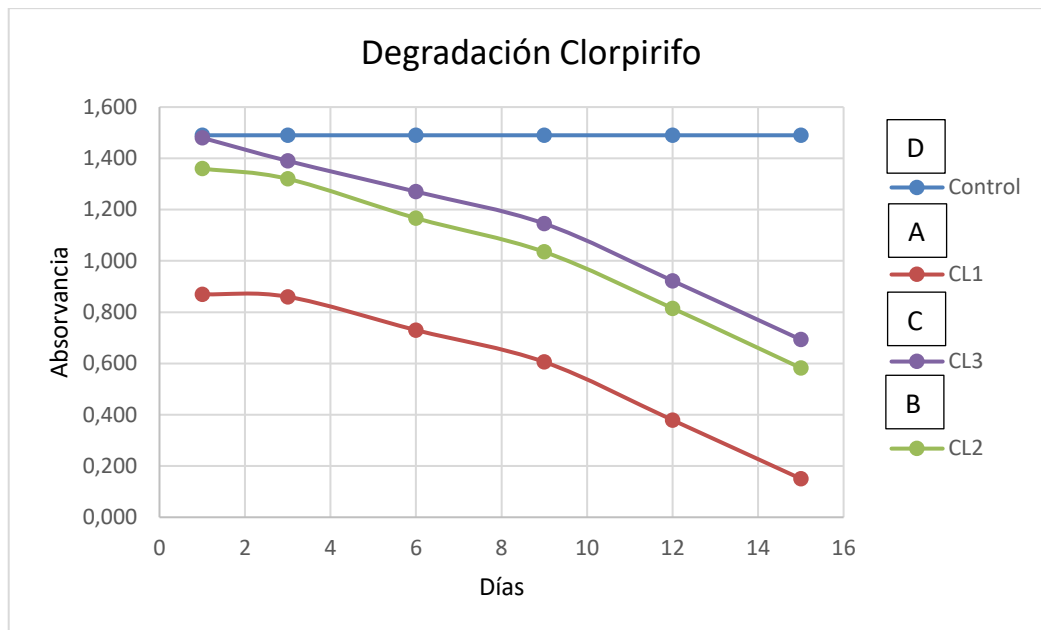


Figura 10. Espectrofotometría Degradación de Clorpirifo. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las líneas de tendencia de cada tratamiento muestran el progreso y disminución del compuesto contaminante, eje de las y muestra los valores de absorbancia y eje de las x proyección en días.

Las cepas CL1, CL2 y CL3 correspondientes al tratamiento Clorpirifo mostraron disminución progresiva en la absorbancia con relación al control, uno de los mejores tratamientos fue la cepa CL1 alcanzando un valor máximo de degradación de 0,15 nanómetros a los 15 días después de la inoculación, la cepa CL3 Y CL2 presentaron disminución en la composición del contaminante con valores de 0,58 y 0,69 nanómetros respectivamente.

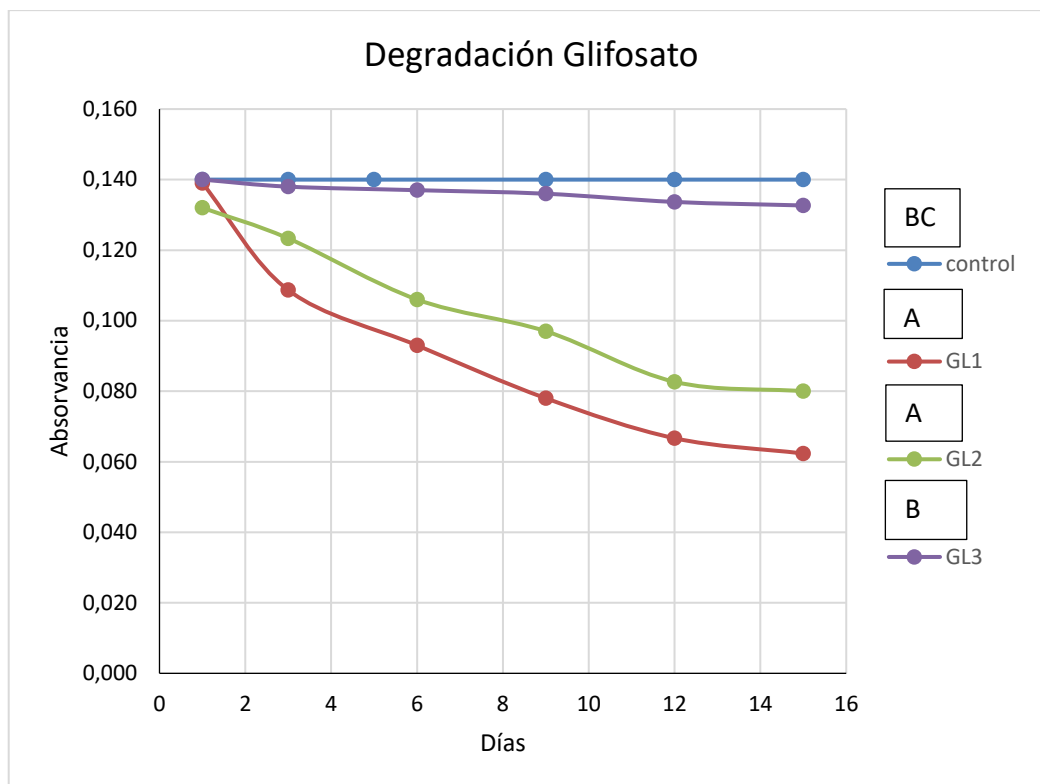


Figura 11. Espectrofotometría Degradación de glifosato. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las líneas de tendencia de cada tratamiento muestran el progreso y disminución del compuesto contaminante, eje de las Y muestra los valores de absorbancia y eje de las X proyección en días.

De las tres cepas bacterianas que conforman parte del grupo glifosato la cepa **GL3** no mostró degradación del medio de cultivo contaminado a pesar de haber generado masa bacteriana en una mínima proporción, como respuesta a la acumulación de sustancias tóxicas en el proceso de descomposición lo cual imposibilita el desarrollo de nuevas células, la cepa **GL1** y **GL2** a los 15 días mostró valores de 0,06 y 0,08 nanómetros respectivamente, donde se destaca su capacidad degradadora haciendo uso de las fuentes de carbono proporcionadas por el pesticida *N*-(fosfonometil) glicina (GLIFOSATO).

4.3 CARACTERIZACIÓN MORFO QUÍMICA.

Los datos de la caracterización morfológica representaron la clasificación de los 3 grupos morfotípicos que comparten características similares, básicamente toda la clasificación pertenece al grupo de las bacterias, con una distinción característica en la cepa **CL2** cuya coloración y forma la separa del grupo. Las pruebas bioquímicas como la catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno separándose los aislados **CL2**, Perteneciente al grupo de los clorpirifos y **GL1, GL2 y GL3** perteneciente al grupo del glifosato que no mostraron reacción a la prueba de la catalasa.

Tabla 6. Caracteres morfológicos y bioquímicos.

CEPA	FORMA			ELEVACIÓN			MARGEN			CATALASA		PROTEASA	
	C	F	G	P	C	PL	E	O	D	P	N	P	N
CL1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
CL2	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
CL3	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
CP1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
CP2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
CP3	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
GL1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
GL2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
GL3	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0

FORMA: Circular (**C**), Filamentosa (**F**), Granular (**G**). **ELEVACIÓN:** Plana (**P**), Convexa (**C**), Pulvinada (**PL**). **MARGEN:** Entera (**E**), Ondulada (**O**), Lobulada (**L**). **CATALASA Y PROTEASA:** Positivo (**P**), Negativo (**N**).

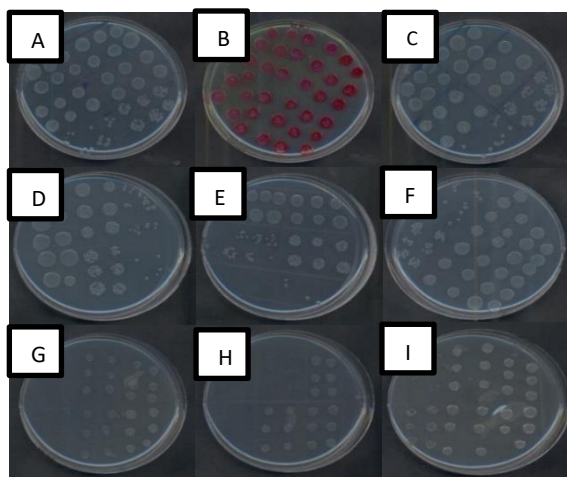


Figura 12. Caracteres morfológicos coloniales. Corresponden a la evaluación de las cepas a las 48 horas de crecimiento en medio King B sólido, **A** CL1, **B** CL2, **C** CL3, cepas pertenecientes al grupo de Clorpirifos. **D** CP1, **E** CP2, **F** CP3, grupo Cipermetrina. **G** GL1, **H** GL2, **I** GL3, grupo Glifosato.

El consorcio microbiano aislado de la BIODÉP encargado de la degradación de pesticidas está conformado principalmente por bacterias gram negativas, como se demuestra en la **figura 13**, donde los tres grupos de aislados se relacionan por la pared de péptido glucano.

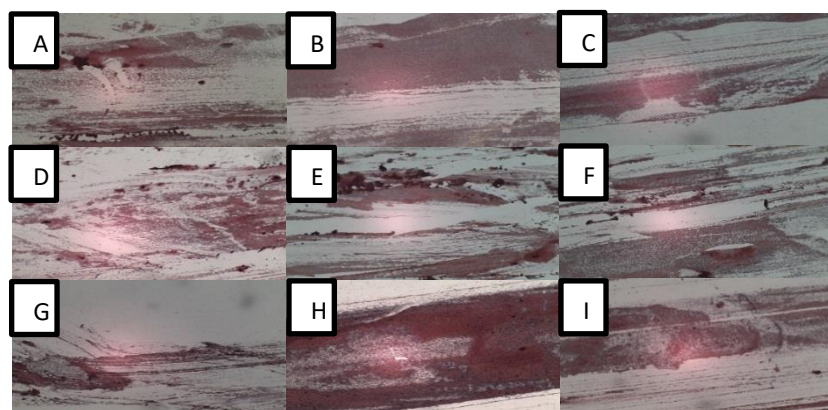


Figura 13. Tinción de GRAM. Células bacterianas con 24 horas de crecimiento en medio de cultivo sólido, **A** CL1, **B** CL2, **C** CL3, cepas pertenecientes al grupo de Clorpirifos. **D** CP1, **E** CP2, **F** CP3, grupo Cipermetrina. **G** GL1, **H** GL2, **I** GL3, grupo Glifosato.

4.4 DISCUSIÓN

Los 6 aislados bacterianos procedentes de la Biodep, encargados de la degradación de pesticidas fueron Gram negativos lo que coincide con lo descrito por (Marín & Jaramillo, Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina, 2015) donde menciona que parte de sus aislados observados a través de su tinción Gram para su identificación tienen porcentaje de confiabilidad del 98% la presencia de *Pantoea agglomerans*, un bacilo gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, es un tipo de bacterias que se encuentra en diferentes matrices ambientales tales como suelo.

La evaluación de la degradación de compuestos contaminantes *Piretroides* (CIPERMETRINA), Organofosforados (*CLORPIRIFOS*) Y *N*-(fosfometil) glicina (GLIFOSATO), se realizó empleando la técnica de espectrofotometría donde se obtuvieron resultados eficientes y valederos haciendo referencia a lo descrito por (Piragauta & Mojica, 2006) donde señala que el empleo de otras técnicas disminuye la cantidad del contaminante presente en el sobrenadante hecho que vuelve compleja la determinación de los residuos de mancozeb en los medios de cultivo cuando se usa el método de HPLC (técnica recomendada que detecta partes por millón de mancozeb), si se quiere saber, si los microorganismos aislados son degradadores de dicho compuesto.

La mayor tasa de degradación de pesticidas fue notoria a los 15 días después de la inoculación, en todos los compuestos contaminados lo que difiere con lo descrito por, (Jaramillo, et al, 2016) quien señala que transcurridas 72 h de incubación se evidenció una marcada disminución del pesticida, la degradación del estándar de monocrotofos fue de hasta un 100% transcurrida 48 horas de incubación.

Dentro de los microorganismos estudiados se encontró gran variabilidad genética comprobada con la técnica molecular ERIC PCR dicho resultado concuerda con lo postulado por (Jaramillo, Bermúdez, & Tirado, 2016) quien determinó que las diferencias encontradas entre los dos métodos de identificación pueden atribuirse a la variabilidad genética debido a intercambio del material entre las especies.

La cepa **GL3** no mostró degradación del medio de cultivo contaminado a pesar de haber generado masa bacteriana en una mínima proporción, como respuesta a la acumulación de sustancias tóxicas en el proceso de descomposición, lo cual imposibilita el desarrollo de nuevas células, esto se ajusta con lo descrito por (Jaramillo, Bermúdez, & Tirado, 2016) quien determinó que en este proceso se producen metabolitos secundarios que, aunque también son considerados contaminantes, probablemente estos sean degradados por la misma vía metabólica, hasta lograr inocuidad.

La cepa (**CP1**), correspondiente al tratamiento de Cipermetrina alcanzó un mayor desarrollo a las 48 y 72 horas, con valores promedios de 8 y 17 mm respectivamente, como respuesta al aprovechamiento de la fuente de carbono proporcionada por el contaminante, dicho resultado concuerda con lo descrito por (Miranda, Delgadillo, Alarcón, & Ferrera, 2007) quien señala que ante la persistencia de los contaminante, algunos microorganismos pueden utilizarlo como fuente de carbono y energía, por lo que se presenta una fase de crecimiento acelerado de la población bacteriana degradadora del contaminante. Pero, como resultado de la reducción de la concentración del contaminante.

La adaptación de los microorganismos a condiciones adversas altera sus funciones básicas, optimizando el uso de los recursos que los rodean como es el caso de fuentes de carbono alternas donde se encuentran los pesticidas *Piretroides*, Organofosforados y *N-*

(fosfometil) glicina. La velocidad de crecimiento en medios donde su única fuente de carbono es un contaminante demuestra un buen aprovechamiento del mismo, dicho resultado no concuerda con lo descrito por (Botero, Nagles, Quintero, & Peñuela, 2011) quienes determinan que el uso del pesticida como única fuente de carbono puede no ser suficiente factor de selección que garantice el crecimiento exclusivo de microorganismos con capacidad de asimilación del MP cuando se implementan procesos de aislamiento por cultivo directo en medios sólidos y suelo como fuente de microorganismos.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

La cantidad de microorganismos presentes en la cama biológica es muy diversa conformándose principalmente por bacterias con mecanismos muy complejos de adaptación y desarrollo. Cada microorganismo cumple un rol importante dentro de la descomposición de compuestos tóxicos.

Las características morfológicas permitieron seleccionar y clasificar los microorganismos en base a las forma, textura y borde de la colonia. Dicho estudio se corroboró con la caracterización molecular asociando los fragmentos generados a partir de ERIC PCR, existiendo gran variabilidad genética debido a la interacción del consorcio microbiano.

Las velocidades de crecimiento de los microorganismos no siempre son indicativos de una degradación eficiente, la composición química de los contaminantes puede proporcionar fuentes de carbono alternas que ayudan al desarrollo de nuevas células bacterias, al agotarse dichas fuentes los microorganismos no pueden asimilar las proporcionadas por el contaminante, agotando o deteniendo su crecimiento.

Los microorganismos seleccionados para la descomposición de Cipermetrina, Clorpirifo y Glifosato cumplieron con su objetivo a los 15 días después de la inoculación bacteriana, como respuesta al aprovechamiento de las fuentes de carbono proporcionadas por los pesticidas.

5.2 RECOMENDACIONES

Emplear el consorcio microbiano procedente de la cama biológica como un conjunto de microorganismos descomponedores de pesticidas.

Evaluar la descomposición por medio de HPLC en fracciones de tiempo más prolongadas, tomando como punto de referencial los datos de absorbancia.

Secuenciar las muestras obtenidas de cada cepa, para su posterior identificación a nivel de género y especie.

Seleccionar microorganismos de crecimiento rápido para la descomposición de Cipermetrina, Clorpirifo y Glifosato.

Bibliografía

- Andrés, D., Antón, J., & Barrio, J. (2008). *Física y Química 4 ESO*. Madrid, España: Editex.
- Antón, J., & Andrés, D. (2016). *Física y Química 4º ESO (LOMCE)*. España: Editex.
- Aquiahuatl, M. (2012). Manual de practicas de Laboratorio Microbiología General. *DBS division de Ciencias y De La Salud*, 28-60.
- ArgenBio. (2007). *Consejo Argentino Para la Información y el Desarrollo de la biotecnología*. Retrieved 10 6, 2017 from <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=202>
- Arístegui, B. (2002). El reino de los hongos. *Rev Iberoam Micol*.
- Asela, M. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud . *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 1-10.
- Ashby, J. (1993). Genetic toxicology in developing countries: comments and recommendations. *Environ*, 335-338.
- Atkins, P., & Jones, L. (2006). *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. México, D.F.: Ed. Médica Panamericana.
- ATSDR. (2003). *PIRETRINAS y PIRETROIDES (PYRETHRINS AND PYRETHROIDS)*. Atlanta: División de Toxicología ToxFAQs.
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. (2003). *Biología: la vida en la tierra*. Barcelona, España: Pearson Educación.
- Bastidas, J., & Cedeño, A. (2016). *Comparación de eficiencia entre Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas putida, y su masificación para la remediación de hidrocarburos totales de petróleo en los pasivos ambientales de AQ-Lab en Puerto Francisco de Orellana*. Riobamba, Ecuador: ESPOCH.

- Bedmar, F. (2011). Informe especial sobre plaguicidas agrícolas. *Universidad Nacional de Mar del Plata*, 27.
- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA - Publicación científica*, 82-90.
- Betancur, B., Pino, N., Peñuela, G., & Cardona, S. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: caso DDT. *Gestión y Ambiente*, 119-135.
- Botero, L., Nagles, N., Quintero, J., & Peñuela, G. (2011). Effect of Methyl Parathion Concentration and Yeast Extract as Factors for Selecting Pesticide Degrading Microorganisms from Polluted Soils. *Ingenierías Universidad de Medellín*, 14-20.
- Bumpus, J. (1993). Fungal degradation of organophosphorus insecticides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39-40.
- Bustamante, T. (2007). *Detrás de la cortina de humo: dinámicas sociales y petróleo en el Ecuador*. Quito, Ecuador: Flacso-Sede Ecuador.
- Carrillo, L. (2003). Estructuras de los hongos. *Microbiología Agrícola*, 553 -757.
- Cuvi, N., & Bejarano, M. (2015). Los halos de inhibición en la remediación de suelos amazónicos contaminados con petróleo. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 1-35.
- Davila, G. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas parafines ambiente . *Mensaje Bioquímico*, 29-55.
- Delong, E. (2004). Microbial population genomics and ecology: the road ahead. *Environment Microbiology*, 6, 875.
- Díez, M. (2011). *Caracterización de la dispersión de contaminantes en la zona costera*. Barcelona, España: Universidad Politécnica de Cataluña.

- Dirección Seccional de Salud de Antioquia. (2005). *Guías de manejo de pacientes Intoxicados*. Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Durán, L., & Ladera, M. (2016). BIORREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED BY ORGANOCLORATED BY THE STIMULATION OF AUTOCONAL MICROORGANISMS, USING BIOSOLIDS. *NEXO*, 22-28.
- Echeverri, G., Manjarrez, G., & Cabrera, M. (2011). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Revistas NOVA*, 76-86.
- FAO. (2010). *Guía para la descripción de suelos*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
- FAO. (2013, Julio 20). *Estructura del suelo: definición e importancia del suelo*. From ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_training/FAO_training/general/x6706s/x6706s07.htm
- Fernández, D. (2010). INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS. *Revista Med*, 84-92.
- Flavio. (2008). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiología*, 30-45.
- Golovleva, L. (1990). The rol and limitations of microorganism in the conversión of xenobiotics. *Puer and apl*, 351-364.
- Golovleva, L. (1990). The rol and limitations of microorganism in the conversión of xenobiotics. *Puer and apl.. Chem*, 351-364.
- Golovleva, L. (1990). *The rol and limitations of microorganism in the conversión of xenobiotics*. Puer and apl.. Chem.
- Gustavo, A. (2010). Morfología y estructura bacteriana. *Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos*, 12 - 1.

- Hirata, R. (2002). Carga contaminante y peligros a las aguas subterráneas. *Revista Latino-Americana de Hidrogeología*, 81-90.
- INEC. (2006). *Instituto Nacional de Estadística y Censo*. Retrieved 10 17, 2017 from http://www.ecuadorencifras.gob.ec/cpv/?option=com_content&view=article&id=232&Itemid=129&lang=es
- Jaramillo, B., Bermúdez, A., & Tirado, I. (2016). Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados presentes en suelos contaminados. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 13-22.
- Jáuregui, J., & Chavez, N. (2006). Glosario de Biotecnología. *Consortios de Universidades Mexicanas*, 59.
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis*. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.
- Labrador, J. (2016, Noviembre 7). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. From Manejo del Suelo: <http://www.fao.org/soils-portal/manejo-del-suelo/es/>
- Lluch, J. (2012). *Tecnología y margen de refino del petróleo*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Lopera, M., Peñuela, G., Domínguez, M., & Mejía, G. (2004). Evaluación de la degradación del plaguicida. *Revista Facultad de Ingeniería* , 58-69.
- López, L. (2016). *Medios de Cultivo para la selección de microorganismos del suelo*. Taragüí: FACULTAD DE AGROINDUSTRIAS.
- Maposita, M., Calle, W., Fiallos, C., & Burgos, F. (2011). *Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos, de tipo Pseudomonas en el sector Río Bonanza, provincia de Pastaza*. Guayaquil, Ecuador: ESPOL-CICYT.

- Marín, L. F., & Jaramillo, B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Chil Nutr*, 179-185.
- Marín, L. F., & Jaramillo, B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Revista chilena de nutrición*, 179-185.
- Marín, L. F., & Jaramillo, B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Revista chilena de nutrición*, 179-185.
- Martinez, C. E. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. *Plant J.* , 209-217.
- McBride, M. (2000). Environmental Chemistry of Soils. *Oxford University Press*, 279-287.
- Miranda, M., Delgadillo, J., Alarcón, A., & Ferrera, C. (2007). DEGRADACIÓN DE FENANTRENO POR MICROORGANISMOS EN LA RIZOSFERA DEL PASTO ALEMÁN. *TERRA Latinoamericana* , 25-33.
- Molina, J. (2015). GENERALIDADES DE BACTERIAS. *UNAM Universidad Autonoma De Mexico*, 14-34.
- Montaño, N. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Ciencia y Cultura ELEMENTOS*, 15 - 23.
- Mosquera, R. (2009). Biodegradación del malatión utilizando microorganismos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 189- 198.
- Núñez, A., Carrera, E., Fernández, M., Bell, A., & Michelena, G. (2012). Selección de una cepa bacteriana y un medio de cultivo industrial para la producción de poli 3-hidroxibutirato. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 49-54.
- Ongley, E. (1997). *Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos*. Burlington, Canadá: GEMS/Water collaborating Center.

- Palleroni. (2006). Introduction to the family pseudomonadaceae. *Springer-Verlag*, 656-694.
- Pérez, M. G. (2014). *EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADADORA Y ACCIÓN DE BIORREMEDIACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN SUELOS CON RESIDUOS DE PESTICIDAS DE LA FLORÍCOLA PENCAFLOR*. Imbabura: UDLA.
- Pérez, R., Camacho, M., Gómez, J., Ábalos, A., & Cantero, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo . *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44-50.
- Pinedo, J. (2005). *El petróleo en oro y negro*. México: LibrosEnRed.
- Piragauta, M., & MoJica, M. (2006). Aislamiento, purificación y selección de bacterias como candidatos para ser utilizadas en procesos de biorremediación de Mancozeb (ethylenebisclothio carbamate) utilizado en cultivos depapa. *Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 157-171.
- Pírez, M. (2006). *Morfología y estructura bacteriana*. Temas de bacteriología y virología médica.
- Poidexter, L., & Miller, P. (1994). *Predicatability of biorremedation perfomance cannon be made with a High level of confidence*. Washington DC, USA.
- Ramírez, F. (2013, Abril 15). *Prezi.com*. From La consistencia del suelo: <https://prezi.com/k703pbxlldzg/untitled-prezi/>
- Rappé, M. (2003). The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* , 369 - 94.
- Rey, A. (2007). Los Hongos en el ecosistema. *Agrupación Micológica A Zarrota*.
- Romero, J., & Echeverría, A. (2016). *EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PESTICIDAS A TRAVÉS DE BIOPILAS CON ADICIÓN DE DOS INÓCULOS DIFERENTES EN*

EL SECTOR GATAZO ZAMBRANO CANTÓN COLTA PROVINCIA DE CHIMBORAZO. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Ruiz, A., & Molina, J. (2010). *Automatización y telecontrol de sistemas de riego*. Barcelona, España: Marcombo.
- Salgado, R., Pineda, G., Mesta, A., Díaz, F., & Wang, E. T. (2008). Degradación de n-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Revista Ciencia y Tecnología*, 123-132.
- Sanchez, M. (2005). LOS PLAGUICIDAS ADSORCIÓN Y EVOLUCIÓN EN EL SUELO. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 30-65.
- Saravia, B. (2010). *Capacidad de intercambio cationico*. Madrid, España: Academia.edu.
- Soler, M. (2003). *Evolución: la base de la biología*. Granada, España: Proyecto Sur de Ediciones.
- Tamura, Koichiro, Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumir, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12):2725-29.
- Torres, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*, 24-34.
- Torstensson, L. (1997). Use of Biobers in Sweden to Minimize Environmental Spillages from Agricultural Spraying Equipment. *Pesticide Outlook*, 24-27.
- Torvisk, V., Ovreas, L., & Thingstad, T. (2003). Prokaryotic Diversity Magnitude, Dynamics and controlling Factors. *Science*, 296,1064.
- Universal, E. (2000). *ESCADEMIC*. Retrieved 9 17, 2017 from Academic: http://enciclopedia_universal.esacademic.com/601/Espora
- UNODC. (2010). Problemática ambiental y la utilización de agroquímicos en la producción de coca. *Naciones Unidas contra la Droga y el Delito*, 60-68.

- Vargas, T., & Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización clínica*, 2594-2598.
- Veas, L. (2015). *Propuesta de uso alternativo del suelo a través de la determinación del índice de erosión potencial del cantón Quevedo aplicando sistemas de información geográfica*. Quevedo, Ecuador: UTEQ-FCAMB.
- Vera, M. S. (2011). Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce. *Acta Toxicol. Argent.*, 87-88.
- Villamil, P. (2015, Septiembre 15). *SlideShare*. From Propiedades de los suelos: <http://es.slideshare.net/ingpaolavillamil15/propiedades-de-los-suelos-52823595>
- Vizcarrondo, M. (2008). *IDENTIFICACIÓN MICROBIANA. Identificación microbiana mediante métodos basados en sistema de utilización de sustratos, inmunoensayos y detección molecular*. Editorial Médica Panamericana.
- Wilson , L., & Sharp, P. (2006). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in Escherichia coli: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution*, 1156–1168.
- Woese, C. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 4576 - 9.

ANEXOS

- Anexo 1

Urkund Analysis Result

Analysed Document: final urkund.docx (D40844328)
Submitted: 8/16/2018 6:45:00 PM
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance: 3 %

Sources included in the report:

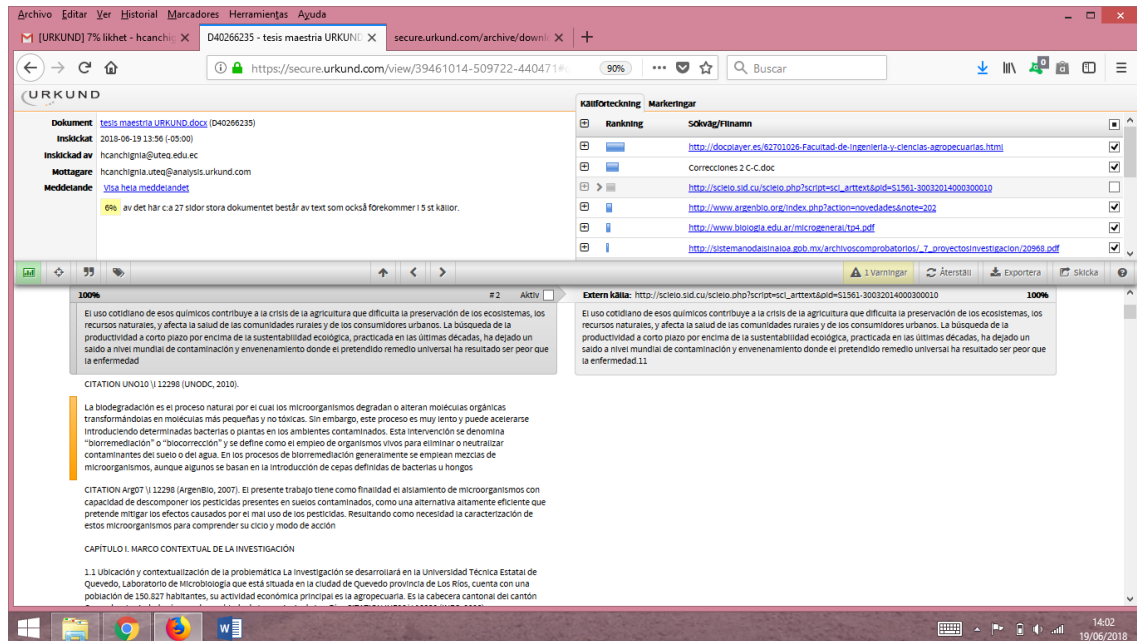
tesis maestria URKUND.docx (D40266235)
URKUn MAJO.docx (D40296480)

Instances where selected sources appear:

2

Certificación anti plagio (URKUND).

- Anexo 2



Captura de pantalla de la tesis en el sistema anti plagio (URKUND).

- Anexo 3



Agitación de muestras y contaminantes para el procedimiento de aislamiento de cepas microbianas.

- Anexo 4



Desarrollo de las colonias microbianas en medios de cultivo contaminado con los pesticidas.