



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MICROORGANISMOS EDÁFICOS  
PARA DEGRADAR PESTICIDAS (LORSBAN 480)

AUTORA

Valerie Arabel Valdiviezo Vilema

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MICROORGANISMOS EDÁFICOS  
PARA DEGRADAR PESTICIDAS (LORSBAN 480).

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera Ambiental en Prevención y  
Remediación.

Profesor Guía  
M.Sc. Miguel Ángel Gualoto Oñate

Autora  
Valerie Arabel Valdiviezo Vilema

Año  
2019

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido revisado este trabajo, Evaluación de la capacidad de microorganismos edáficos para degradar pesticidas (Lorsban 480), a través de reuniones periódicas con la estudiante Valerie Arabel Valdiviezo Vilema, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

---

Miguel Ángel Gualoto Oñate

Master of Science en Biología

C.I: 1707429351

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

“Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación de la capacidad de microorganismos edáficos para degradar pesticidas (Lorsban 480), de la estudiante Valerie Arabel Valdiviezo Vilema, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

---

Indira Fernandina Black Solís

Magister en Conservación y Gestión del Medio Natural

C.I: 171127356-3

## **DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE**

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

---

Valerie Arabel Valdiviezo Vilema

C.I: 0604331249

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por haberme guiado durante cada paso de mi vida.

A mis padres Miguel Ángel y Dora Alicia, por todo el amor que siempre me han brindado, por siempre darme lo mejor, por ser ejemplo a seguir y enseñarme a no rendirme.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, que han sido un pilar fundamental en mi vida.

A mis hermanos Miguel y Henry que son un apoyo.

A mi tutor, M.Sc. Miguel Gualoto, por su paciencia, dedicación, orientación durante todo este proceso.

## RESUMEN

El Ecuador es uno de los países con mayor exportación de brócoli en el mundo, principalmente la provincia de Cotopaxi crece alrededor de 68% de brócoli destinado a exportación, si bien, genera ingentes recursos para la economía nacional y puestos de trabajo; el incremento de la producción tiene efectos sobre los suelos, por el masivo uso de pesticidas. Los residuos pesticidas tienden a acumularse en lo suelos, generando el bloqueo de los procesos bioquímicos del suelo e inhibiendo el crecimiento de los microorganismos benéficos, factor que incide en la producción agrícola a mediano y largo plazo. En estas circunstancias, es imperioso el desarrollo de metodologías de descontaminación de suelos, que impidan la migración de los pesticidas a los productos y a través de ellos a las cadenas tróficas. Una de las metodologías más eficientes para la descontaminación, es la biorremediación. Para el presente proyecto se emplearon suelos dedicados al cultivo de brócoli, contaminados con pesticidas de la parroquia Poaló, con el propósito de aislar microorganismos autóctonos, tolerantes a los pesticidas y con capacidad de degradar pesticidas. El estudio se llevó a cabo, bajo condiciones controladas de laboratorio, donde se estudió la dinámica de crecimiento bacteriano, la cinética del proceso de degradación del pesticida y se identificó las especies ensayadas. Para evaluar la capacidad de degradar pesticidas se realizaron pruebas de turbidez, de las pruebas positivas se seleccionaron las de mayor turbidez, con estas se efectuaron las pruebas de degradación de pesticidas; se determinó la cinética de crecimiento y la tasa de degradación del pesticida por medición de la absorbancia. En las pruebas se empleó el pesticida organofosforado LORSBAN 480 a dos diferentes concentraciones (800 -1600 ppm), se consiguió aislar e identificar 3 distintas bacterias con capacidad de degradar este pesticida, *Pseudomona* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. Se determinó que *Bacillus cereus* presento una tasa de degradación más eficiente a los 30 días (96%), mientras que *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas* sp. (73% de degradación). Estas diferencias observadas si mostraron significancia estadística. Finalmente, se concluyó que las cepas bacterianas aisladas en Poaló son capaces de crecer en un sustrato contaminado con pesticida y degradarlo de manera eficiente.



## ABSTARCT

Ecuador is one of the countries with the largest export of broccoli in the world, mainly the province of Cotopaxi grows around 68% for export, and although it generates huge resources for the national economy and jobs, the increase in production has effects on the soil, due to the massive amount of pesticides. Pesticide residues tend to accumulate in soils, generating a blockage in the biochemical processes of the soil and inhibiting the growth of beneficial microorganisms, this is one factor that affect to agricultural production. In these circumstances, it is necessary to development of soil decontamination methodologies that impede the migration of pesticides to the products and through them to the food chains. One of the most efficient methodologies for decontamination is bioremediation. For this project, I used soils contaminated with pesticides from Poaló, with the purpose to isolate autochthones microorganism, to tolerate and with capacity to degrade pesticides. The study was carried out under controlled laboratory conditions, where studied the dynamic of microbial growth, the kinetic of pesticides degradation and identification the tested species. To evaluated the capacity of degrade pesticide, turbidity test were performed, with the positive test were made degradation test, it is determinate the growth kinetic and degradation rate of pesticide by the absorption mediation. In the tests, the organophosphorus pesticide was used with two concentration (800-1600ppm), it was possible to isolate and identify 3 different bacterium's with the ability to degrade this pesticide, *Pseudomona* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus cereus* showed a more efficient degradation rate (96%) in 30 days, and *Bacillus thuringiensis* and *Pseudomonas* sp., showed 73% of degradation rate. These differences sowed that exist statistical significance. Finally, the conclusion is that bacterium strains isolated are able to grow in a substrate contaminated with pesticides and degraded efficiently.

# ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Problemática .....	2
1.3. Hipótesis.....	3
1.3.1. Hipótesis Nula .....	3
1.3.2. Hipótesis Alternativa.....	3
1.4. Objetivos .....	3
1.4.1. Objetivo General.....	3
1.4.2. Objetivo Especifico .....	3
1.5. Alcance .....	3
1.6. Justificación .....	4
2. Marco Teórico.....	5
2.1. Pesticidas.....	5
2.2. Clasificación de los pesticidas.....	6
2.2.1. Herbicidas.....	6
2.2.2. Insecticidas.....	11
2.2.3. Fungicidas .....	16
2.3. Uso de pesticidas en Ecuador .....	19
2.4. Degradación de pesticidas .....	24
2.4.1. Proceso de transformación de los pesticidas .....	28
2.4.2. Tipos de Degradación.....	32
2.4.3. Rutas Metabólicas .....	38
2.4.4. Experiencias de degradación de pesticidas en Ecuador .....	38
3. Metodología.....	39
3.1. Toma de muestra de suelo .....	41
3.2. Aislamiento bacteriano y siembra mediante diluciones .....	46
3.3. Determinación de la eficiencia de las especies aisladas .....	46
3.4. Identificación bioquímica .....	47
3.5. Pruebas de degradación de pesticidas.....	47
3.6.1. Determinación de la tasa de crecimiento.....	49
3.6.2. Transformación de valores de absorbancia a concentración ....	49

3.6.3. Determinación de la tasa de degradación .....	50
3.6.4. Determinación de tiempo de vida media .....	51
3.6.5. Determinación de la eficiencia en porcentajes .....	51
3.7. Análisis de resultados .....	51
<b>4. Resultados.....</b>	<b>52</b>
4.1. Colonias identificadas .....	52
4.2. Pruebas de Turbidez .....	54
4.3. Características bioquímicas e identificación de especies.....	58
4.4. Pruebas de degradación .....	60
4.5. Determinación de datos cinéticos .....	66
4.5.1. Tasa de crecimiento .....	66
4.5.2. Tasa de degradación .....	68
4.5.3. Tiempo de vida media.....	71
4.5.4. Eficiencia .....	71
4.6. Análisis estadístico .....	73
<b>5.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>76</b>
5.1 Conclusiones.....	76
5.2 Recomendaciones .....	77
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>93</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La contaminación ambiental debido al crecimiento de la población, la industrialización, urbanización, ha incrementado el riesgo de afectación a la salud humana. Uno de los principales contribuyentes de la contaminación son los pesticidas, que se utilizan ampliamente para el control de plagas de los cultivos y evitar las pérdidas económicas, causada por el bajo rendimiento de los mismos (Gouma.2009). Otro componente de importancia son los agroquímicos, que en gran medida incluyen a fertilizantes químicos nitrogenados y fosforados (Carvalho,2006). La aplicación constante de pesticidas conlleva a su volatilización a la atmosfera, razón por la que aproximadamente el 90% no logran su objetivo debido, esto es el control de plagas y se dispersan a través del aire, agua y suelo. Así el 63% de los pesticidas se hallan en los componentes ambientales como agua suelo y aire. (Yates. 2011).

Anualmente se estima que se emplean 5,2 millones de estos compuestos (Grube et al., 2011). De estos 2.4 millones de toneladas métricas se aplican para el control de malezas, 2.8 millones de toneladas métricas en insectos, hongos y otros organismos (Grube et al., 2011). La revolución verde, durante los años 1960 – 1980, en la producción de granos, que satisfagan a la creciente población humana empleo grandes cantidades de pesticidas, que condujeron a la pérdida de fertilidad del suelo, la acidificación, la lixiviación de nitratos a niveles freáticos, el aumento de la resistencia de las especies de malezas y la pérdida de biodiversidad (Tilman et al. 2002; Verma et al. 2013).

Según la FAO, en países como Italia, se consumen 63,305 ton / año de pesticidas, Turquía (60,792.4 ton / año), Colombia (48,618.47 ton / año), India (40,379.24 ton / año), Japón (36,557 ton / año), Bolivia. (31,566.76 ton / año), Ecuador (31,203.1 ton / año) Alemania (27,585.49 ton / año), Rumania (26,506.74 ton / año) y Chile (18,032 ton / año) (FAO.2010; World Bank 2010, Schreinemachers and Tipraqsa 2012).

El uso de plaguicidas en Ecuador y países en desarrollo, los agricultores son más vulnerables a sufrir daños causados por estos, debido a que no se toma en cuenta factores sociales y económicos (Sherwood *et al.*, 2007; Dale, 2008; Orozco *et al.*, 2009). La falta de infraestructura, agua, facilidades sanitarias, vivienda inadecuada y programas de extensión agrícola son muy limitadas, son factores que influyen en la salud de los agricultores de baja escala (Cole *et al.*, 2002, Orozco *et al.*, 2009).

De acuerdo a los datos obtenidos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), Ecuador cuenta con una superficie de 2'595.075 hectáreas destinadas a la agricultura, de las cuales 1'191.131 hectáreas tienen afectación de plaguicidas, alrededor del 66% de los productores utilizan regularmente algún tipo de pesticida (INIAP.2011). En Ecuador, un promedio de 15,630 toneladas métricas de ingredientes activos (pesticidas) fueron utilizados anualmente en campos agrícolas durante el periodo 2010 – 2014, datos publicados por la FAO (FAOSTAT, 2017).

El presente estudio se limitará al aislamiento de microorganismos de suelos con historial de contaminación en cultivos de brócoli, donde se evaluará la capacidad de degradar pesticidas, evidenciando el crecimiento microbiano.

## **1.2. Problemática**

Desde los años noventa, el crecimiento comercial del brócoli ha ido en aumento, por ende, los agricultores usan grandes cantidades de pesticidas en los cultivos para el control de malezas, insectos y otras plagas y así mejorar la productividad y obtener beneficios económicos (Tsiplakou *et al.* 2010). Cilla.2013, menciona que los plaguicidas son contaminantes persistentes que resisten en grado de variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que el tiempo de vida media en el ambiente puede ser elevada.

La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, regula y controla productos químicos implementados en la agricultura, aplicando la normativa nacional, internacional y de la Comunidad Andina, el principal

propósito es asegurar la calidad, eficiencia e inocuidad para el control de plagas a nivel de cultivo (AGROCALIDAD, 2017). Es preocupante el incremento y el uso de compuestos químicos en los últimos cien años debido a los efectos negativos que producen en el ecosistema.

### **1.3. Hipótesis**

#### **1.3.1. Hipótesis Nula**

La tasa de degradación de pesticidas organofosforados varía en relación a la especie microbiana empleada.

#### **1.3.2. Hipótesis Alternativa**

La tasa de degradación de pesticidas organofosforados no varía en relación de la especie microbiana empleada.

### **1.4. OBJETIVOS**

#### **1.4.1. Objetivo General**

Evaluar la capacidad de microorganismos edáficos para la degradación del pesticida (LORSBAN 480).

#### **1.4.2. Objetivo Especifico**

- Identificar las bacterias del suelo de cultivo de brócoli, en base a características bioquímicas.
- Comparar la eficiencia de las bacterias aisladas en la degradación de LORSBAN 480 (Clorpirifos).
- Definir los parámetros cinéticos del proceso de degradación de LORSBAN 480 con bacterias aisladas de cultivos de brócoli.

### **1.5. Alcance**

El presente trabajo investigativo se limitó al aislamiento de microorganismos de suelos con historial de contaminación por Lorsban 480 empleados en cultivos de brócoli, para evaluar la capacidad de degradación de este pesticida en pruebas

de laboratorio ejecutadas en Universidad De Las Américas. El avance de la degradación del pesticida se evidenciará mediante el crecimiento microbiano a través de conteo de UFC's y por espectrofotometría.

### **1.6. Justificación**

Actualmente existe gran interés sobre los contaminantes ambientales, donde los residuos ambientales se consideran como sustancias altamente tóxicos en los alimentos, por lo que es un motivo de preocupación para los consumidores (Pérez, Segura, García, Colinas, Pérez, Vázquez & Navarro. 2009).

En las últimas décadas las utilizaciones irracionales de insecticidas químicos han provocado que la plaga *Plutella xylostella* se convierta en uno de las plagas que se han vuelto muy resistentes y provocan la contaminación del medio ambiente, esto es debido a la falta de alternativas que conlleven a dar las posibles soluciones para el control sin causar daño al cultivo del brócoli y sus enemigos naturales. Existen alternativa como el uso de insecticidas botánicos, son accesibles y de bajo costo para los campesinos que en su mayoría habitan zonas infestadas por plagas debido a varias de estas crecen con gran facilidad o son nativas de estas áreas geográficas y la obtención de los extractos activos no requiere de metodologías complejas (Iannacone & Lamas, 2003).

Debido a la gran importancia de la hortaliza, se prevé que en los próximos 50 años será necesario incrementar la producción agrícola para satisfacer la demanda de la población mundial. Los cultivos de brócoli en Ecuador necesitan altas dosis de fertilizantes, por lo que es necesario buscar métodos de producción agronómica y económicamente sustentables para proteger el entorno. Por lo que la educación en el uso de fertilizantes nitrogenados y fosforados sintéticos (fuentes inorgánicas) por la fijación biológica del nitrógeno y solubilización biológica del fósforo; contribuirán en la reducción de la contaminación del aire y agua dando una alternativa de producción para los productores de brócoli (Nicolade & Quintana, 2010).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Pesticidas

El uso de plaguicidas es importante en el control de numerosos insectos, nematodos, hongos, maleza y otros organismos que compiten con el hombre por productos agropecuarios y forestales (Lagunes y Villanueva 1994). Las actividades agrícolas son el sector productivo de mayor exposición a este tipo de contaminantes (Pitarch *et al.* 2001, Waliszewski e Infanzón 2003, Hernández *et al.* 2007). Una de las formas de exposición a los plaguicidas para los humanos y los animales es por medio de la ingesta de alimentos contaminados, la absorción dérmica y la inhalación de vapores emitidos (Jury *et al.* 1983, Mathies *et al.* 1991).

Los plaguicidas se dividen de acuerdo a su acción insecticida entre los que tenemos a insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Los insecticidas organoclorados fueron desarrollados poco antes o durante la segunda Guerra Mundial por Müller. El DDT dio inicio una revolución en el campo de los pesticidas que incorporó productos derivados de síntesis orgánica a la lucha contra plagas y enfermedades (Albert y Loera, 2005). En los años cincuenta se desarrollaron compuestos organofosforados (OF) (de Silva *et al.*, 2006), de estos alrededor de cincuenta mil tipos de estos compuestos que se utilizan principalmente en la agricultura como fertilizantes e insecticidas (Eddleston *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Algunos plaguicidas de los grupos organofosforados, carbamatos, piretroides, ditiocarbamatos y triazoles se emplea en cultivos de brócoli, estos pesticidas son clasificados como altamente tóxicos ya que pueden generar severos problemas a la salud del consumidor (Perez.2009). Durante el ciclo de cultivo, los OP son utilizados para el control de insectos por su alta efectividad y bajo costo, sin embargo, sus residuos han sido detectados con alta frecuencia en los suelos en todo mundo (Chromatogr. A .2008).

Los plaguicidas organoclorados imitan, incrementan o inhiben la acción de las hormonas, alterando el funcionamiento del sistema endocrino, dañando la salud reproductiva y promoviendo el desarrollo de carcinomas (López *et al.* 2002,



Waliszewski *et al.* 2005). Los plaguicidas organoclorados y piretroides empleados ampliamente en el cultivo de brócoli, generan desequilibrios en los ecosistemas donde se liberan, afectan a la salud de los agricultores y consumidores (Gutiérrez, Pinzón, Londoño, Blanch, & Rojas, 2010).

Según Calonge *et al.* (2002), estos plaguicidas han sido prohibidos y sustituidos por plaguicidas organofosforados, siendo hoy dominantes como plaguicidas fitosanitarios a pesar de su problemática toxicológica. Las normas de su empleo son cada vez más estrictas en Estados Unidos, Canadá y países de la unión europea (Dogheim *et al.* (1999), adicionalmente se monitorea sus residuos en los productos de consumo.

Químicamente, los compuestos organofosforados (OF), son ésteres, aminas o tioles que se derivan de ácido fosfórico (OMS/OPS. 1993 - Saleh 1994.). Estos compuestos una buena capacidad de descomposición y degradación por oxidación e hidrólisis, originando productos solubles en agua, menos persistentes y poco acumulables en el cuerpo humano (OMS/OPS. 1993).

Las propiedades físico – químicas de los compuesto organofosforados varían de acuerdo a la estructura química que posean, estos son poco solubles en agua, escasamente en kerosene, éter de petróleo y solventes parafinados, pero a su vez se disuelven fácilmente en alcohol, acetona, benceno tolueno, xilol y aceite de pino (Fernández, 1970).

## **2.2. Clasificación de los pesticidas**

En este capítulo se describirá las principales clases de pesticidas, según el grupo químico al cual pertenecen, junto con sus principales propiedades fisicoquímicas (Arregui & Puricelli, 2008, Pág., 757-764).

### **2.2.1. Herbicidas**

Son productos fitosanitarios que se utilizan para matar plantas indeseadas, por ende, preservan la cosecha ilesa. Algunos herbicidas interfieren con el crecimiento de las malas hierbas, se utilizan para limpiar terrenos de gran dimensión (Flores, 2010).

Los herbicidas se aplican directamente en el suelo o al follaje, que son absorbidos por las raíces o por los tejidos de las hojas, si matan toda la vegetación son totales, en tanto que, si controlan la maleza sin afectar el cultivo, son selectivos (Tadeo, Brunete & González, 2008).

Los herbicidas se clasifican de acuerdo a la composición química en:

#### 2.2.1.1.1. Amidas

Su fórmula general es  $R_1 - CO - N - (R_2, R_3)$ . Los componentes clave de este grupo son las cloroacetamidas N-sustituidas y las anilidas sustituidas. Un ejemplo es herbicida es 2,4 D Amina Zamba (Tadeo, Brunete & González, 2008).

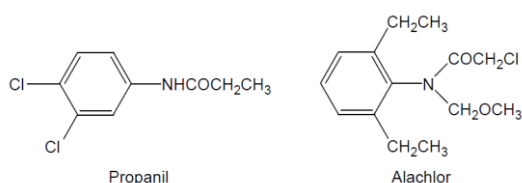


Figura 1. Fórmula de herbicidas Amidas.

#### 2.2.1.1.2. Derivados de Ácido Benzoico

Está formado por derivados clorados sustituidos del ácido benzoico sustituidos, tienen propiedades reguladoras del crecimiento y actividad auxina, se utilizan para controlar malezas perennes de raíces profundas (Tadeo & Brunete & González, 2008).

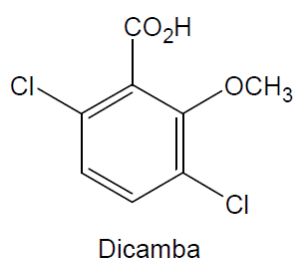


Figura 2. Fórmula de herbicidas derivados de ácido benzoico.

#### 2.2.1.1.3. Nitrilos

Están formulados como sales o ésteres de octanoato, se aplican en cereales y cultivos hortícolas para controlar malezas, en combinación con otros herbicidas

para extender el espectro de especies de malezas a controlar (Tadeo & Brunete & González, 2008).

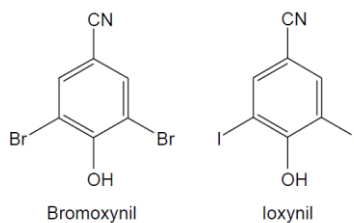


Figura 3. Fórmula de herbicidas nitrilos.

#### 2.2.1.1.4. Carbamatos

Son ésteres del ácido carbámico ( $R_1 - O - CO - NR_2R_3$ ) y junto con los tiocarbamatos ( $R_1 - S - CO - NR_2R_3$ ). Su función principal es inhibir de forma reversible la acetilcolinesterasa, causando espasmos y parálisis en insectos y mamíferos (Bretaud *et al.* 2000, Jiandong *et al.* 2007, Dong *et al.*, 2012).

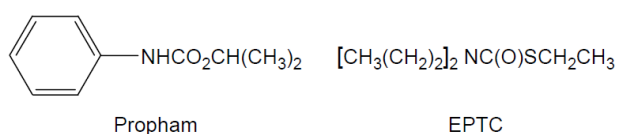


Figura 4. Fórmula de herbicidas carbamatos.

#### 2.2.1.1.5. Nitroanilinas

Compuestos derivados de 2,6-dinitroanilina. Tienen baja solubilidad en agua y el coeficiente de partición de octanol en agua. Se aplican directamente al suelo para controlar malezas Tadeo, Brunete & González, 2008).

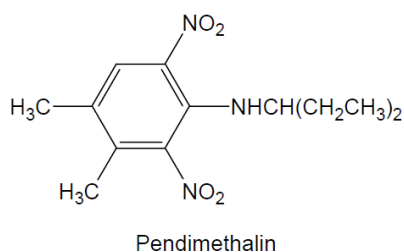


Figura 5. Fórmula de herbicidas Nitroanilinas.

### 2.2.1.1.6. Organofosforados

Tienen un amplio espectro, no selectivos, se utilizan para el control de malezas en sistemas acuáticos y para el control de vegetación en áreas sin cultivo Tadeo, Brunete & González, 2008).

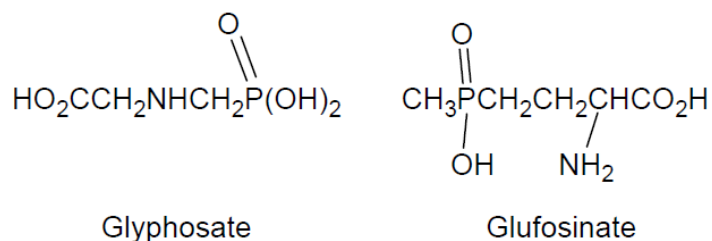


Figura 6. Fórmula de herbicidas organofosforado.

### 2.2.1.1.7. Ácido PHENOXY

Están formados por estereoisómeros, se utilizan en plántulas jóvenes para el control de malezas en cultivos de cereal y pastos Tadeo, Brunete & González, 2008).

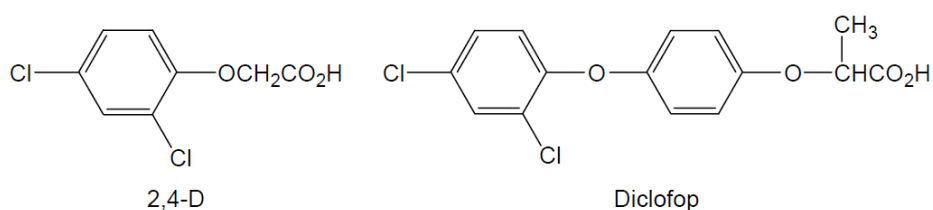


Figura 6. Fórmula de herbicidas ácido Phenoxy.

### 2.2.1.1.8. Piridinas y Compuestos de Amonio Cuaternario

Los componentes de estos pesticidas son el paraquat y diquat, estos compuestos desecan plantas jóvenes. Los compuestos de amonio cuaternarios como el clormequat y el mepiquat son reguladores de crecimiento de las plantas y promueven la floración en las plantas ornamentales Tadeo, Brunete & González, 2008).

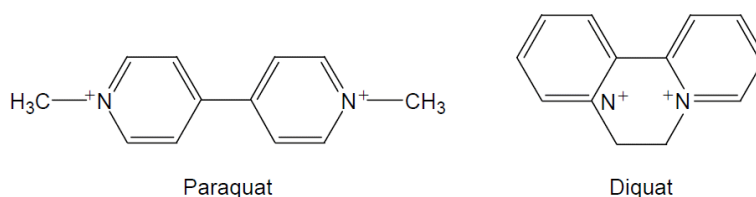


Figura 7. Fórmula de herbicidas piridinas y compuestos de amonio cuaternario.

### 2.2.1.1.9. Piridazinas y Piridazinones

Son herbicidas que se utilizan para controlar pastos anuales, malezas en las hojas y malezas herbáceas en cereales, maíz y otros cultivos, estos herbicidas son de larga duración en el suelo. En este grupo se incluyen a: Piridato y piridazinonas así como a Norfluzazon y chloridazon Tadeo, Brunete & González, 2008).

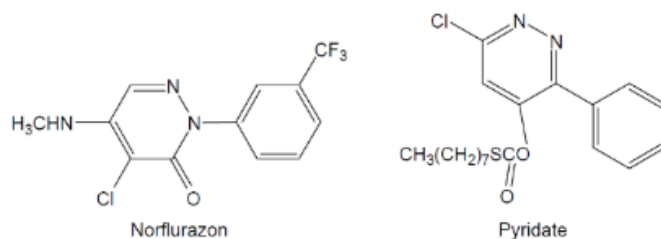


Figura 8. Fórmula de herbicidas Piridazinas y Piridazinones.

### 2.2.1.1.10. Triazinas

Estos se han utilizado durante largo tiempo para matar las malezas en varios cultivos, tiene gran eficacia en bajas dosis, para matar las malezas, en altas concentraciones se utiliza para la esterilización del suelo Tadeo, Brunete & González, 2008).

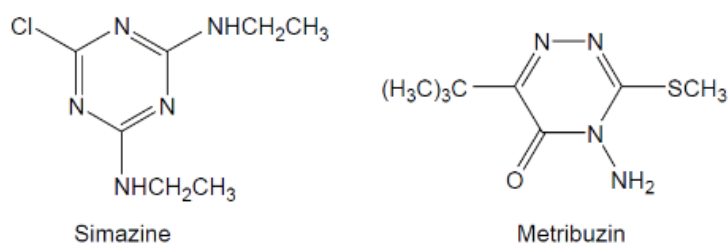


Figura 9. Fórmula de herbicidas Triazinas.

### 2.2.1.1.11. Ureas

#### a. Fenilureas

Se derivan de los herbicidas de urea  $\text{H}_2\text{NC}(=\text{O})\text{NH}_2$ , se aplican directamente al suelo para el control de las gramíneas anuales en varios cultivos. Tienen una persistencia variable en el suelo depende de la composición química Tadeo, Brunete & González, 2008).

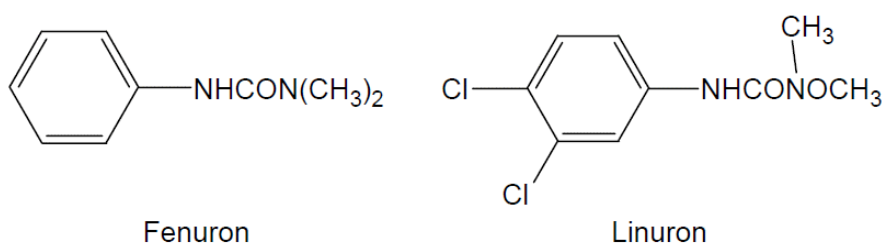


Figura 10. Fórmula de fenilureas.

### b. Sulfolureas

Son las más recientes ya que tienen una actividad herbicida mayor a los herbicidas de fenilureas, pueden ser absorbidas por el follaje y las raíces, tienen una persistencia notable en el campo (Tadeo, Brunete & González, 2008).

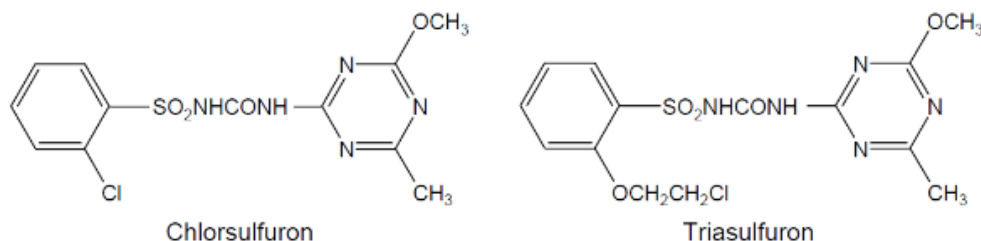


Figura 11. Fórmula de Sulfolureas.

### 2.2.2. Insecticidas

Klimmer (1968), menciona que los insecticidas, son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de plagas como insectos, microbios. El efecto de los insecticidas sobre la fisiología de estos organismos es complejo ya que tiene varias reacciones físico- químicas que afectan a una especie de insecto en particular (Romanyk y Cadahia, 2002).

Entre los insecticidas más empleados podemos mencionar:

#### 2.2.2.1. Benzoylureas

Son utilizados como insecticidas porque actúan sobre el proceso de muda de insectos, es decir, regulan el crecimiento de insectos, interfiriendo con la formación de quitina en el exoesqueleto de insectos vital (Tadeo, Brunete & González, 2008).

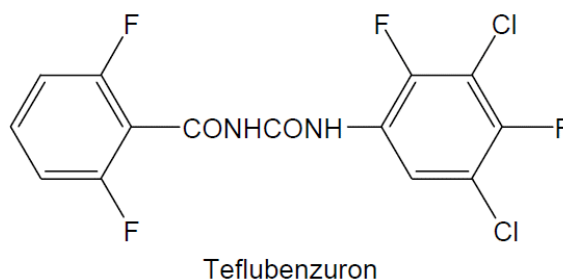


Figura 12. Fórmula de insecticidas Benzoylureas.

#### 2.2.2.2. Carbamatos

Son ésteres del ácido carbámico con sustitución tanto en el grupo amino como carboxilato ( $R^1-NH-CO-OR$ ) (Stella, Borchardt, Hageman, Oliyai, Maag, & Tilley, 2007).

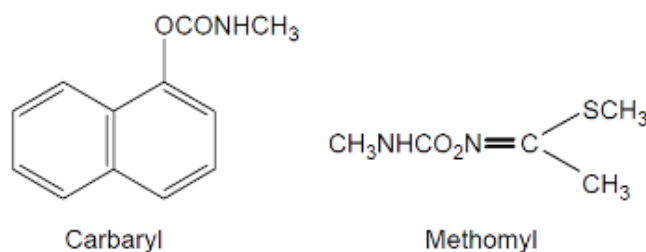


Figura 13. Fórmula de insecticidas carbamatos.

#### 2.2.2.3. Organoclorados

El Manual de Plaguicidas (1999), señala que su estructura principal está formada por una cadena de átomos de carbono y como grupos sustituyentes al átomo de cloro.

Se caracterizan por tres tipos de productos químicos: análogos de DDT, son compuestos derivados de isómeros hexacloruro de benceno (BHC), y compuestos clicodieno.

Son utilizados para el control de plagas de insectos de frutas, vegetales y algodón como insecticidas del suelo y para el tratamiento de semillas. Debido a su persistencia y toxicidad, la mayoría de estos compuestos organoclorados han sido analizados y el plaguicida ha sido restringido (Tadeo, Brunete & González, 2008).

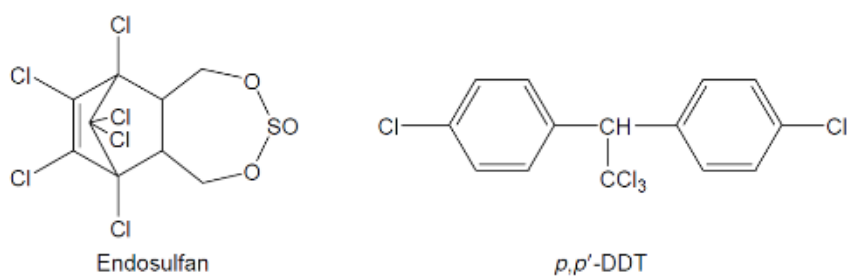


Figura 14. Fórmula de insecticidas organoclorados.

#### 2.2.2.4. Organofosforados

Son compuestos de hidrocarburos que contienen uno o más átomos de fósforo en su molécula. Varios tipos de insecticidas organofosforados tienen acción no residual y acción residual prolongada. Son compuestos solubles en agua y se disipan del suelo unas pocas semanas después de la aplicación debido a su baja persistencia y alta efectividad (Tadeo & Brunete & González, 2008).

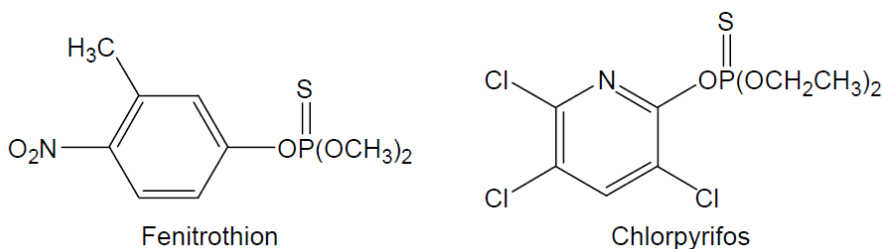


Figura 15. Fórmula de insecticidas organofosforados.

Tabla 1.

*Nombres químicos y propiedades de los insecticidas organofosforados*

Nombre común	Nombre UIPAC	Presión de Vapor mPa (20°C)	Kow Log P	Solubilidad del agua mg/L (20°C)	Tiempo de vida media en suelos (días)
Azinphos-methyl C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	S(3,4-Dihydro-4-oxobenzo [d]-[1,2,3]triazin-3-ylmethyl)  O,O-dimethyl phosphorodithioate	5x10 <sup>-4a</sup>	2.96	28	10-40



Chlorfenvinphos C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)vinyl diethylphosphate		1	3.85	145 <sup>b</sup>	-
Chlorpyrifos C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	O,O-Diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate		2.7	4.7	1.4 <sup>b</sup>	35-56
Chlorpyrifos-methyl C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	O,O-Dimethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate		3	4.24	2.6	1.5-33
Coumaphos C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClO <sub>5</sub> PS	O-3-Chloro-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl O,O-diethyl phosphorothioate		0.013 <sup>a</sup>	4.13	1.5	-
Diazinon C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	O,O-Diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate		12	3.30	60	11-21
Dichlorvos C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	2,2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate		2.1x10 <sup>3</sup>	1.9	18,000	0.5
Dimethoate C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	O,O-Dimethyl S-methyl carbamoylmethyl phosphorodithioate		0.25	0.704	23,800	2-4
Fenitrothion C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub> PS	O,O-Dimethyl O-4-nitro-m-tolyl phosphorothioate		18 <sup>a</sup>	3.43	14 <sup>b</sup>	12-18
Fenthion C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	O,O-Dimethyl O-4-methylthio-m-tolyl phosphorothioate		1.4	4.84	4.2	34

Malathion C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	S-1,2-Bis(ethoxycarbonyl) ethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate	1.1 <sup>a</sup>	2.75	145 <sup>b</sup>	1
Methamidophos C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub> PS	O,S-Dimethyl phosphoramidothioate	2.3 <sup>a</sup>	-0.8	>2x10 <sup>5</sup>	6
Methidathion C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	S-2,3-Dihydro-5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3-ylmethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate	0.25 <sup>a</sup>	2.2	200 <sup>b</sup>	3-18
Oxydemeton-methyl C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	S-2-Ethylsul_nylethyl O,O-	3.8 <sup>a</sup>	-0.74	1x10 <sup>6</sup>	2-20
Phosmet C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	O-O-Dimethyl phtalimidomethyl phosphorothioate	0.065	2.95	25 <sup>b</sup>	4-20
Pirimiphos-methyl C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	O-2-Diethylamino-6-methylpyrimidin-4-yl O,O-diethyl phosphorothioate	2 <sup>a</sup>	4.2	10	3.5-25
Profenofos C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> BrClO <sub>3</sub> PS	O-4-Bromo-2-chorophenyl O-ethyl S propyl phosphorothioate	0.12	4.44	28 <sup>b</sup>	7
Trichlorfon C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	Dimethyl 2,2,2-tricholo-1-hydroxyethylphosphonate	0.5	0.43	1.2x10 <sup>5</sup>	5-30

---

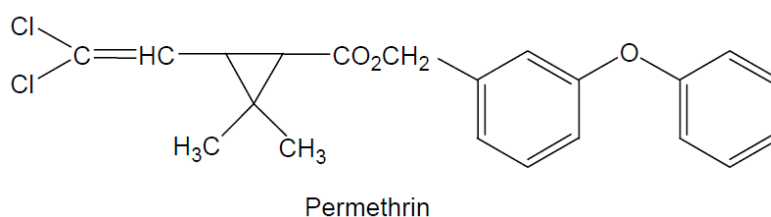
**Tomado de:** Tomlin. (2000)

Nota: <sup>a</sup> 20°C

<sup>b</sup> 25°C

### 2.2.2.5. Piretroides

Son insecticidas naturales, extraídos de las flores de ciertas especies de crisantemos. Dichos compuestos se degradan en el suelo y no tienen efectos detectables en la micro flora del suelo (Tadeo, Brunete & González, 2008).



*Figura 16.* Fórmula de insecticidas piretroides.

### 2.2.3. Fungicidas

Son sustancias químicas empleadas para impedir el crecimiento o para eliminación de hongos o mohos, tienen la capacidad de penetrar en el tejido vegetal, son inocuos para las plantas y atacan directamente al hongo. Los fungicidas son utilizados en la industria, agricultura, así como en el hogar para proteger las semillas, flores y frutos (EPA, 2005).

Entre los fungicidas de mayor uso están:

#### 2.2.3.1. Azoles

Está presente en varios compuestos biológicos activos el anillo de imidazol, mientras otros solo tienen un anillo de triazol. Tienen una acción sistemática, eficaces contra varios hongos fitopatógenos, se aplica en el follaje. Estos fungicidas son poco solubles en agua, aunque sus sales son solubles en el agua (Tadeo, Brunete & González, 2008).

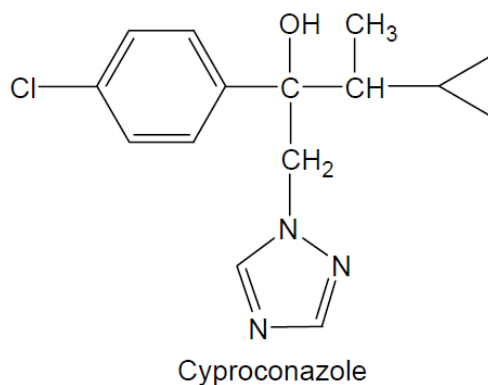


Figura 17. Fórmula de fungicidas Azoles.

### 2.2.3.2. Benzimidazoles

Tienen una acción sistemática, son absorbidos por las raíces de las plantas, se utilizan en la protección de las plantas en forma de sus sales insolubles. Se aplica en el follaje y en suelo y se utiliza para el tratamiento de semillas (Tadeo, Brunete & González, 2008).

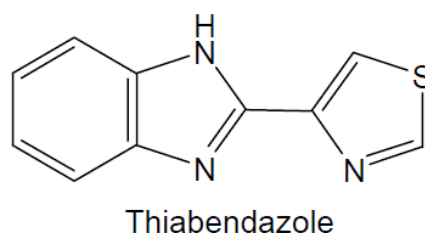


Figura 18. Fórmula de fungicidas Benzimidazoles.

### 2.2.3.3. Ditiocarbamatos

Son compuestos de sales de metales pesados de etilenisiditio carbamato y estas sales son habitualmente estables y adecuadas de fungicidas. DITHIOCARBAMATES son orgánicos y los más utilizados para frutas, verduras (Tadeo, Brunete & González, 2008).

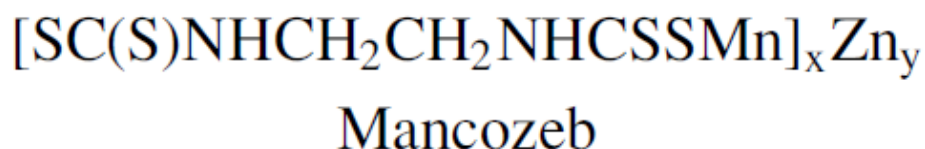


Figura 19. Fórmula de fungicidas Ditiocarbamatos.

#### 2.2.3.4. Morfinas

Son fungicidas utilizados contra los hongos y se usan para controlar la enfermedad en cereales, pepinos, manzanas. Este se distribuye por medio de la translocación desde la raíz y el follaje lo que permite que la planta no se infecte de hongos (Tadeo, Brunete & González, 2008).

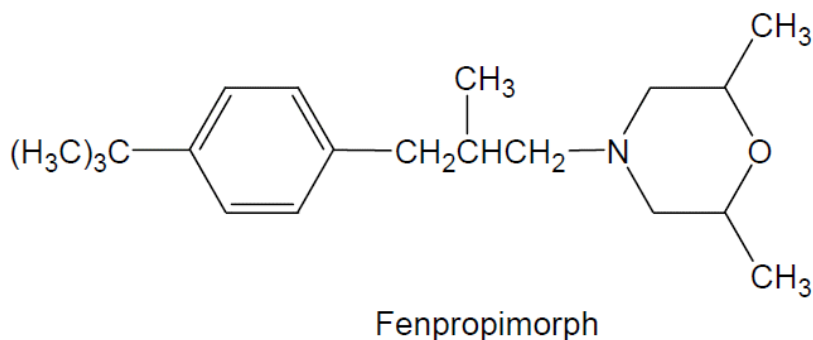


Figura 20. Fórmula de fungicidas Morfinas.

#### 2.2.3.5. Miscellaneous

Uno de los fungicidas más utilizados son el Captan y Folpet para el tratamiento foliar de las frutas, vegetales y plantas ornamentales. Procimidona es un fungicida derivado de dicarboximida con acción sistémica moderada, tiene gran capacidad de absorción en la raíz, tallo u hojas, se utiliza para el controlar el almacenamiento de raíces de frutas y verduras (Tadeo, Brunete & González, 2008).

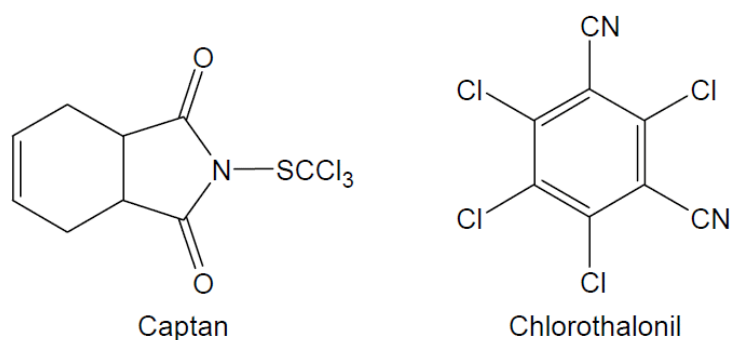


Figura 21. Fórmula de fungicidas Miscellaneous.

Tabla 2.

*Nombres químicos y propiedades de los fungicidas de morfolina*

Nombre común	Nombre UIPAC	Presión de Vapor mPa (20°C)	Kow Log P	Solubilidad del agua mg/L (20°C)	Tiempo de vida media en suelos (días)
Dodemorph C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	4-ylododecyl-2,6-dimethyl morpholine	0.48	4.14	<100	73
Fenpropimoprh C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> NO	(+)- <i>cis</i> -4-[3-(4tert-Butylphenyl)-2-methylpropyl]-2,6dimethylmorpholine	3.5	4.2	4.3	15 -93
Tridemorph C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> NO	2,6-Dimethyl-44-tridecyl morpholine	12	4.2	1.1	14 -34

Tomado de (Tadeo & Brunete & González, 2008).

### 2.3. Uso de pesticidas en Ecuador

La aparición en Ecuador de los primeros plaguicidas sintéticos llegó en la década de los 40, para los consumidores, los cultivos de banano, cacao y frutas tropicales de exportación. Desde 1993, se realizó importaciones para satisfacer la demanda nacional de agroquímicos, después de la fecha empezó la fabricación local de algunos compuestos activos en tres plantas sintetizadoras y nueve formuladoras (Mariño, 2005).

Actualmente, la demanda de pesticidas ha incrementado sensiblemente en el cultivo de brócoli, por cuanto este producto no tradicional, dispone de un amplio mercado internacional y demanda creciente en los países desarrollados, donde existe una gran oportunidad para incrementar la exportación (Francescángeli, et al., 2003). La exportación de brócoli, constituye una alternativa importante para los agricultores, frente a los productos tradicionales (Francescángeli, et al., 2003). Ecuador es el noveno productor de brócoli fresco a nivel mundial y es uno de los tres primeros proveedores de brócoli congelado hacia Europa (Le Gall, 2009).

En el 2007, gracias a la mejora en los terrenos, capacitaciones a productores investigación y mejora en la cadena de producción y comercialización, el brócoli se constituyó como un gran producto de exportación, (MADR, 2006). Le Gall. 2009, menciona que los cultivos de altura ubicados entre los 2700- 3200 msnm, limitan la presencia de plagas debido a las fluctuaciones de temperatura, lo que permite una producción de 3 cosechas anuales. En los cultivos de brócoli, se aplican principalmente plaguicidas de los grupos organofosforados, carbamatos, piretroides, ditiocarbamatos, triazoles, varios de estos son clasificados como altamente tóxicos, pudiendo generar severos problemas a la salud de los consumidores (Perez,2009).

El cultivo de brócoli es afectado por la plaga, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) conocida como palomilla dorso de diamante, considerada como multiresistente a diversos tipos de insecticidas convencionales de los grupos químicos: organofosforados, carbamatos y piretroides. Adicionalmente es citada como resistente a la toxina del *Bacillus thuringiensis* BERNILER var. Kurstaki (Liu et al., 1982; Pedroso de Moraes & Amilton, 2012).

Los plaguicidas organoclorados y piretroides son los más empleados para el control de esta plaga, con buenos resultados, sin embargo, el uso masivo de estos compuestos genera desequilibrios ambientales, que afecta no solo al entorno, sino también, a los agricultores y consumidores (Gutiérrez, Pinzón, Londoño, Blanch, & Rojas, 2010), debido a su incorporación a las cadenas tróficas (Torres, 2002). Las plagas inciden en el rendimiento y en la calidad de los cultivos, generando pérdidas económicas y de mercados (Trujillo, 2008).

Los pesticidas empleados experimentan procesos de descomposición y degradación en diferentes compartimientos ambientales, generando con frecuencia metabolitos de mayor toxicidad ambiental, para su monitoreo y análisis, se han desarrollado diversas metodologías de extracción e identificación de estos residuos en el suelo, agua y aire, con el propósito de asegurar la conservación del ambiente (Mojica- Guerrero, 2010).

A más de la “palomilla dorso de diamante”, al brócoli le afectan otras plagas tales como:

- **Gusano trozador (*Agrotis sp*):** larva de pequeño tamaño, se alimenta de las raíces y tejidos jóvenes. Este tipo de gusano, corta los tallos de las plantas y posteriormente causa la muerte de la planta. (Pinzón e Isshiki, 2001).
- **Pulgón (*Brevicoryne brassicae*):** son insectos que se propagan en el envés de la hoja y que causan deformaciones durante épocas secas (Proexant, 1992).
- **Gusano Minador (*Plutella xylostella*):** se alimenta del follaje, afectando directamente a las pellas de brócoli. Tienen gran resistencia a los plaguicidas (Díaz, 1999).

En la tabla No 3, se puede evidenciar otro grupo de plagas que afectan al brócoli.

Tabla 3.

*Principales plagas en el cultivo de brócoli.*

Plaga	Ingrediente Activo	Dosis
Gusano Barrenador	Endosulfan	1.5 cc/l
( <i>Hylemia brassicae</i> )	Clorpirifos	2,5 cc/l
( <i>Agrotis spp.</i> )	Endulsofan	1,5 cc/l
Plutella	Cipermetrina	1 cc/l

Tomado de (Solagro, 2009).

Adicionalmente a las larvas e insectos, al brócoli le afectan enfermedades bacterianas y fúngicas que se adaptan a los sistemas intensivos de explotación de brócoli (Falconi, 2000). En la tabla No 5, se puede ver las enfermedades más comunes del brócoli.



Tabla 4.

*Principales enfermedades en el cultivo de brócoli.*

<b>Enfermedades</b>	<b>Ingrediente Activo</b>	<b>Dosis</b>
Alternaria ( <i>Altermaria spp.</i> )	Fosetil Aluminio	1-1,5 cc/l
	Clorotalonil	2,5 cc/l
Mal de Almacigo ( <i>Phythium spp.</i> , <i>Fusarium</i> <i>spp.</i> , <i>Rhizoctonia</i> <i>spp.</i> )	Propamocarb	2 l/ha
	Sulfato de cobre Pentahidratado	1-2 cc/l
Mildiu ( <i>Peronospora</i> <i>spp.</i> )	Dimetomorph	1 l/ha
	Fosetil Aluminio	3-4 kg/ha

Tomado de (Solagro, 2009).

Al Ecuador han ingresado 214764 toneladas de pesticidas durante el periodo 2008 -2015, por un valor de 1608 millones de dólares. La importación ha ido en aumento, colocándonos como el país con mayor consumo de pesticidas después de Colombia, superando a Bolivia y Perú. En la tabla No 3, se puede ver las importaciones durante el periodo 2006 -2015.

Tabla 5.

*Importaciones de plaguicidas en Ecuador 2006 – 2015.*

<b>Año</b>	<b>Valor de Importaciones (Miles de dólares)</b>	<b>Toneladas de importaciones de pesticidas</b>
2006	129 098	23 925
2007	127 131	21 790
2008	210 238	31 304
2009	167 614	21 863
2010	216 944	28 263
2011	215 708	28 793
2012	232 003	31 678
2013	235 964	31 482
2014	278 874	36 004
2015	261 071	36 681

Tomado de (Cálculos de CCI basado en estadísticas de UN COMTRADE, 2006 -2015)

## 2.4. Degradación de pesticidas

Actualmente existen diversas tecnologías para la recuperación de suelos contaminados, con pesticidas, una alternativa es la biorremediación, que aprovecha el potencial metabólico de los microorganismos (bacterias y hongos) que los transforman en compuestos más simples (Torres & Zuluaga, 2009).

Gilani et al. 2010, menciona que los pesticidas organofosforados son difíciles de degradar debido a su baja solubilidad. El insecticida clorpirifos, se degradan a 3, 5,6-tricloro-2-piridinol en 34 -36 días, en presencia de microorganismos productores de lípidos, (Swati & Singh, 2002). En agua dulce, el clorpirifos se disipa por acción microbiana, en tanto que, en agua de mar, se inhibe (Bondarenko et al, 2004., Pág. 2649–2654.).

Bacterias del genero *Lactobacillus*, (que incluyen *L. bulgaricus*, *L. paracasei* y *L. plantarum*), reducen el grado de toxicidad de los compuestos gracias a una acelerada degradación de estos compuestos (Zhao & Wang, 2012). También se ha empleado, *Pseudomonas aeruginosa* ch7, en la descontaminación de suelos afectados por organofosforados (Antolínez et al, 2001).

En 1973, la primera bacteria degradadora de compuestos OP, se identificó como *Flavobacterium* sp. ATCC 27551, aisladas de suelos en Filipinas. En la *Tabla 7* se puede ver los microorganismos involucrados en la degradación de distintos pesticidas organofosforados.

Tabla 6.

*Degradación de diferentes organofosforados por microorganismos.*

Microorganismos	Referencia

---

Clorpirifós	<p><i>Bacillus pumilus</i> C2A1, <i>Streptomyces chattanoogensis</i> cepa cgmcc 4.1415, <i>Streptomyces olivochromogenes</i> cepa xsd08162, <i>Verticillium</i> sp. Cepa dsp, <i>Serratia marcescens</i>, <i>Alcaligenes</i> sp. jas1, <i>Enterobacter</i> sp. B-14, <i>Cupriavidus</i> sp.dt-1, <i>Klebsiella</i> sp. cpk, Consorcio microbiome (<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp.</p> <p><i>Rhizobium</i> sp., <i>Comamonas aquatica</i>, <i>Staphylococcus hominis</i>, <i>Klebsiella</i> sp., <i>Aspergillus niger</i>, <i>Trichophyton</i> sp. y <i>Streptomyces radiopugnans</i>), <i>Spergillus terreus</i> jas1, <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Eurotium</i> sp., <i>Emericella</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Brevundimonas</i> sp., <i>Diaphorobacter</i> sp. gs-1, <i>Pseudomonas putida</i> F1</p>	<p>Singh et al. 2006; Fang et al. 2008; Li et al. 2008; Anwar et al. 2009; Chanika et al. 2011; Liang et al. 2011; Briceño et al. 2012; Maya et al. 2012; Sasikala et al. 2012; Silambarasan y Abraham 2012; Cycoñ et al. 2013; Lu et al. 2013; Silambarasan y Abraham 2013; Wang et al. 2013</p>
Fenamifos	<p><i>Pseudomonas putida</i> F1, <i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> cepa bihb723, Consorcio microbiano, <i>Pseudomonas putida</i>, <i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> cepa bihb723</p>	<p>Singh et al. 2006; Chanika et al. 2011; Abo-Amer 2012</p>

---

Tributil fosfato	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> mhf env, <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Providencia</i> sp., <i>Ralstonia</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Delftia</i> sp.	Ahire et al. 2012; Chaudhari et al. 2012
Malatión	<i>Pseudomonas putida</i> cepa is168, <i>Brevibacillus</i> sp. cepa kb2, <i>Bacillus cereus</i> cepa PU	Goda et al. 2010; Singh et al. 2012
Metamidofos	<i>Penicillium oxalicum</i> zhj6	Zhao et al. 2010
	<i>Hyphomicrobium</i> sp. map-1	Wang et al. 2010
Forato	Consorcio microbiano ( <i>Ralstonia eutropha</i> ,	Rani y Juwarkar 2012
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter cloacae</i> )	
Dimetoato	<i>Paracoccus</i> sp. cepa Lgjj-3	Li et al. 2010
Paratión	<i>Serratia marcescens</i>	Cycoń et al. 2013
Metil paratión	<i>Acinetobacter radioresistens</i> ustb-0	Liu et al. 2007

Fenitrotión	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Burkholderia</i> sp. cepa fds-1	Hong et al. 2007; Cycoñ et al. 2013
Diclorvos	<i>Ochrobactrum</i> sp. cepa ddv-1	Zhang et al. 2006
Profenofos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Malghani et al. 2009
Triazofos	<i>Diaphorobacter</i> sp. gs-1	Liang et al. 2009
Cadusafos	<i>Pseudomonas putida</i>	Abo-Amer 2012
Etoprofos	<i>Pseudomonas putida</i>	Abo-Amer 2012
Isofenfos	<i>Pseudomonas putida</i>	Abo-Amer 2012
Isazofos	<i>Pseudomonas putida</i>	Abo-Amer 2012

Fention	<i>Pseudomonas putida F1</i>	Chanika et al. 2011
Tetraclorvinfos	Consortio ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Vibrio metschnikovii</i> , <i>Serratia ficaria</i> , <i>Serratia</i> spp. y <i>Yersinia enterocolitica</i> ), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Vibrio metschnikovii</i> , <i>Serratia ficaria</i> , <i>Serratia</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i>	Ortiz-Hernández y Sánchez-Salinas 2010

Tomado de (Hernández, Álvarez & Osorio ,2016).

#### 2.4.1. Proceso de transformación de los pesticidas

Según, Bansal. (2004, Pág. 507 -513), en el proceso de transformación de los pesticidas operan fuerzas físicas, y procesos químico – biológicos tales como:

**a. Oxidación:** las reacciones de oxidación química involucran oxígeno molecular, mientras que la oxidación biológica se produce por la enzima oxidasa de función mixta. Las reacciones oxidativas específicas en la degradación de plaguicidas son:

- Hidroxilación del anillo

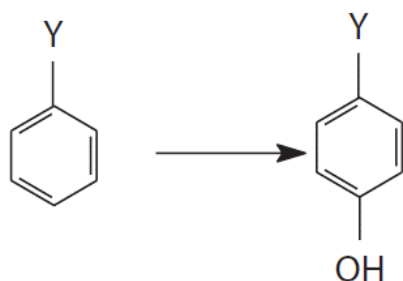


Figura 22. Fórmula de la Hidroxilación del anillo durante el proceso de la transformación de oxidación de pesticidas.

- Oxidación de la cadena lateral

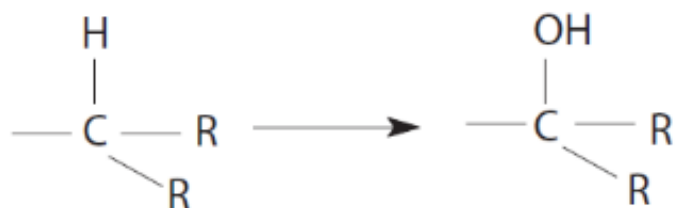


Figura 23. Fórmula de la Oxidación de la cadena lateral durante el proceso de la transformación de oxidación.

- Epoxidación



Figura 24. Fórmula de Epoxidación durante el proceso de la transformación de oxidación de pesticidas.

- O-desalquilación



Figura 25. Fórmula de la O-desalquilación durante el proceso de la transformación de oxidación de pesticidas.

- N-desalquilación

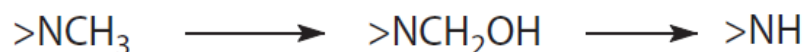


Figura 26. Fórmula de la N-desalquilación durante el proceso de la transformación de oxidación de pesticidas.

- S- desalquilación



Figura 27. Fórmula de la S-desalquilación durante el proceso de la transformación de pesticidas.



- Desulfuración oxidativa



Figura 28. Fórmula de la desulfuración oxidativa durante el proceso de la transformación de oxidación de pesticidas.

- Oxidación de aminas



Figura 29. Fórmula de la oxidación de aminas durante el proceso de la transformación de oxidación de pesticidas.

- Sulfoxidación



Figura 30. Fórmula de la Sulfoxidación durante el proceso de la transformación oxidación de pesticidas.

**b. Hidrólisis:** el grupo éster del pesticida sufre escisión hidrolítica, en forma química o enzimática:

- Hidrólisis del éster

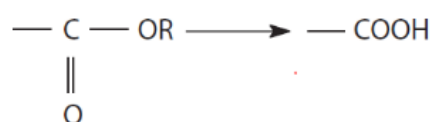


Figura 31. Fórmula de la hidrólisis de éster durante el proceso de la transformación de hidrólisis de pesticidas.

- Hidrólisis de epóxidos



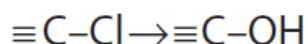
Figura 32. Fórmula de la hidrólisis de éster durante el proceso de la transformación de hidrolisis de pesticidas.

- Hidrólisis de amida



*Figura 33.* Fórmula de la hidrólisis de amida durante el proceso de la transformación de hidrolisis de pesticidas.

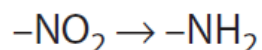
- Hidrólisis de halógenos



*Figura 34.* Fórmula de la hidrólisis de halógenos durante el proceso de la transformación de hidrolisis de pesticidas.

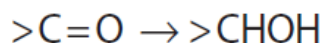
**c. Reducciones:** en este proceso ocurre cuando exista una baja concentración de oxígeno molecular, por lo que ciertos sustratos xenobioticos aceptan uno o dos electrones proporcionados por el sistema microsomal con participación del Citocromo P-450, en lugar del oxígeno (Klaassen et al, 1986; Gilman et al, 1990; Shibamoto & Bdjeldanes, 1996).

- Grupo Nitro



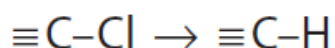
*Figura 35.* Fórmula de reducciones del grupo Nitro durante el proceso de la transformación de reducciones de pesticidas.

- Grupo cetónico



*Figura 36.* Fórmula de reducciones del grupo cetónico durante el proceso de la transformación de reducciones de pesticidas.

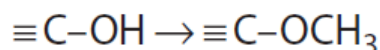
- Deshalogenación reductiva



*Figura 37.* Fórmula de reducciones del deshalogenación reductiva durante el proceso de la transformación de reducciones de pesticidas.

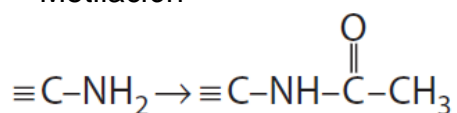
**d. Conjugación:** son el resultado de la ruptura enzimática de los conjugados de glutatión, la conjugación inicial para los substratos alifáticos o aromáticos, requieren una variedad de enzimas del tipo glutatión-transferaras (Jakoby, 1980 & Manahan, 1990).

- Metilación



*Figura 38.* Fórmula de conjugación de metilación durante el proceso de la transformación de conjugación de pesticidas.

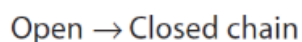
- Metilación



*Figura 39.* Fórmula de conjugación de metilación durante el proceso de la transformación de conjugación de pesticidas.

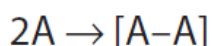
**e. Reorganización:** mediante la transformación de un isómero a otro, producida por agentes físicos o químicos.

- Ciclación



*Figura 40.* Reorganización de ciclación durante el proceso de la transformación de reorganización de pesticidas.

- Dimerización



*Figura 41.* Reorganización de ciclación durante el proceso de la transformación de reorganización de pesticidas.

## 2.4.2. Tipos de Degradación

### 2.4.2.1. Degradación Química

En la degradación química influyen varios factores como: El contenido de materia orgánica, el contenido de arcilla; que influyen en la degradación química de los

pesticidas ya que estas proporcionan una superficie mayor para la degradación hidrolítica. A continuación, enumeramos otros factores que inciden sobre la degradación de pesticidas.

- pH: afecta el proceso hidrolítico de la disipación de pesticidas, que depende de la naturaleza de los pesticidas.
- Temperatura: Al aumentar la temperatura, las moléculas tienen mayor movimiento y mayor reacción, lo que provoca un ritmo más acelerado en la reacción de hidrólisis.
- Naturaleza de los sustituyentes: existen algunos sustituyentes que pueden ser reemplazados de manera fácil del sustrato por reacción de hidrólisis, puesto que los productos formados son muy estables en agua.
- Riego de efluentes: mejora la degradación química de los pesticidas ya que altera el pH de la solución del suelo y aumenta el contenido de materia orgánica disuelta (Müller et al, 2007).
- La presencia de residuos de cultivos y la concentración de pesticidas.

#### 2.4.2.1.1. Degradación química de pesticidas organofosforados

Los OP, sufren oxidación en el agua o suelo en presencia de cloro, convirtiendo los enlaces P = S en P = O. El paratión o el mediación, son esteres organofosforados que se hidrolizan para formar alcohol y ácido fosfórico (Washburn 2003; Fan & Lio 2009).

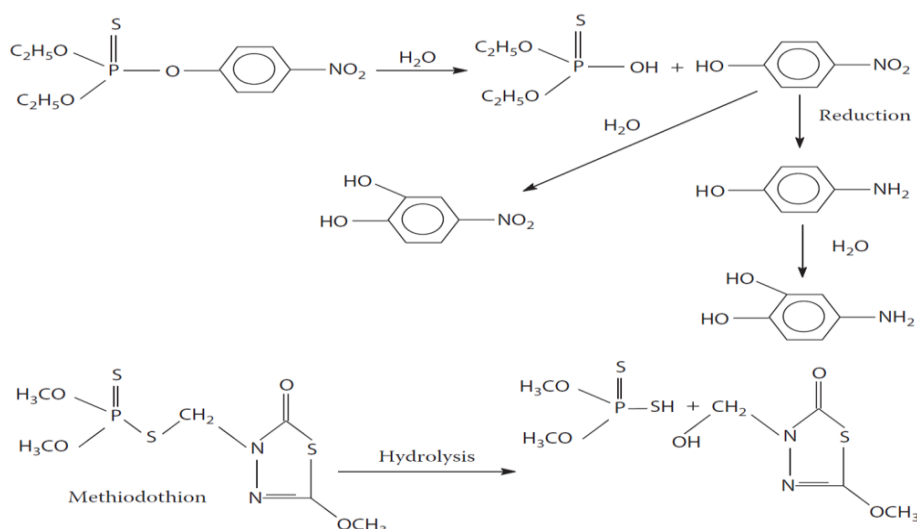


Figura 42. Proceso de hidrólisis de los pesticidas paratión y mediación.

Mientras que los clorpirifos, se hidroliza fácilmente en medio alcalino (Gilani et al, 2010).

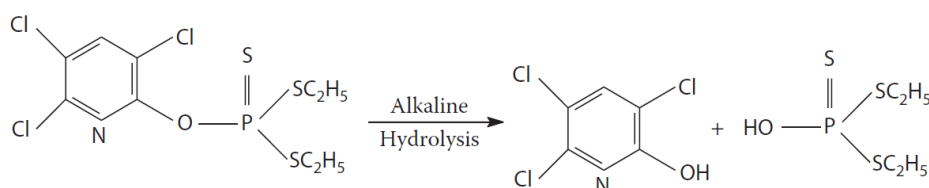


Figura 43. Proceso de hidrolisis de Clorpirifos.

#### 2.4.2.2. Fotodegradación

Es la descomposición de los pesticidas por acción de la luz solar, en la superficie del suelo, follaje e incluso en el aire. La foto degradación de pesticidas en el suelo aumenta la presencia de materia orgánica como los ácidos húmicos, fúlvico, y pigmentos como la clorofila entre otros. Durante la reacción de fotodegradación de pesticidas, se forman radicales libres  $\cdot\text{CH}_3$ ,  $\cdot\text{R}$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{NO}\cdot$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{NO}_3$ , etc., para su formación se requieren alrededor de 400KJ/ de energía (de  $\sim 300$  nm de longitud de onda).

En el proceso de la fotodegradación de pesticidas, existen diferentes tipos de fotorreacciones: reacción tipo I de Norrish, Reacción tipo II de Norrish.

Adicionalmente participan en reacciones de isomerización geométrica u óptica, de escisión del éster, descarboxilación, descarbonilación, deshalogenación, desalquilación. C oxidación, S oxidación, reordenamiento y ciclación, que permiten a degradación completa de los pesticidas. A manera de ejemplo mostramos algunas de estas reacciones:

#### 1. Isomerización (geométrica u óptica)

a.

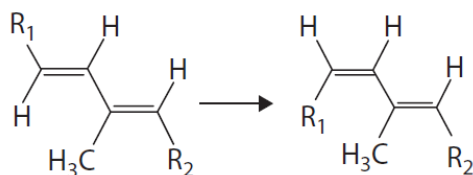


Figura 43. Proceso de isomerización por medio de fotodegradación.

b.

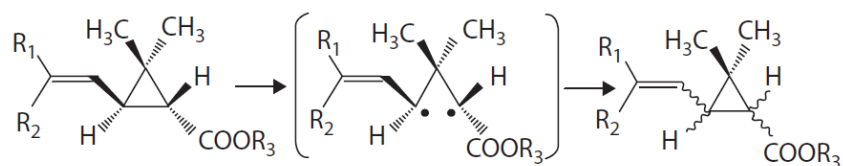


Figura 44. Proceso de isomerización por medio de fotodegradación.

2. Escisión del éster, descarboxilación, descarbonilación

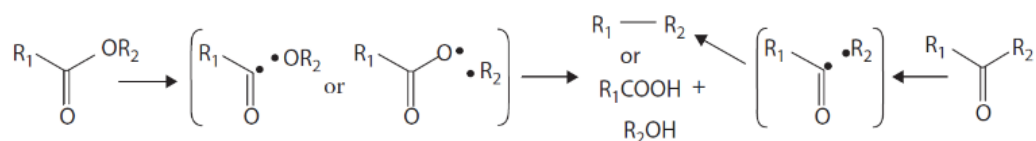


Figura 45. Proceso de Escisión del éster, descarboxilación, descarbonilación por medio de fotodegradación.

3. Deshalogenación



Figura 46. Proceso de deshalogenación por medio de fotodegradación.

4. Desalquilación

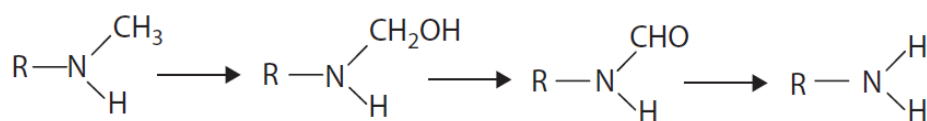


Figura 47. Proceso de desalquilación por medio de fotodegradación.

5. C-Oxidación

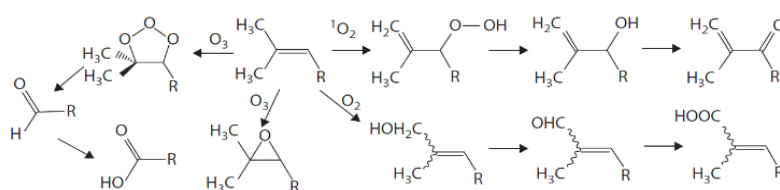


Figura 48. Proceso de C-Oxidación por medio de fotodegradación.

## 6. S-Oxidación

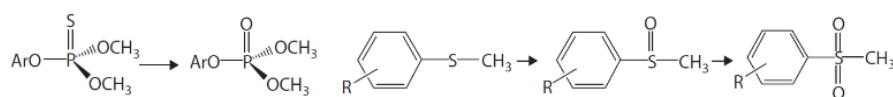


Figura 49. Proceso de S-Oxidación por medio de fotodegradación.

### 2.4.2.2.1. Fotodegradación de pesticidas organofosforados

Los OP de fórmula.

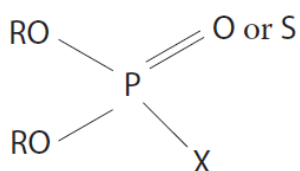


Figura 50. Formula de la fotodegradación de pesticidas organofosforados

Donde:

X: grupo alifáticos, homocíclicos o heterocíclicos

R: grupo alquilo

Sufren degradación fotoquímica por escisión del éster, reducción, oxidación del grupo tio-éter, isomerización, deshalogenación, deshidrohalogenación, desalquilación, ciclación, dimerización, etc.

El insecticida del grupo Clorpirifos tienen un amplio espectro, en la fotólisis en presencia de luz UV sufren desulfuración oxidativa, deshalogenación y reacciones hidrolíticas como:

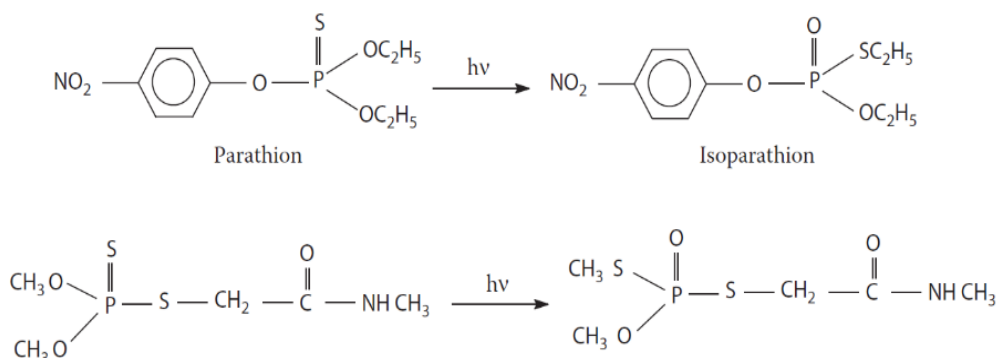


Figura 51. Reacciones hidrolíticas de los pesticidas organofosforados.

### 2.4.2.3. Degradación Microbiana

Durante este proceso, el pesticida se absorbe en la membrana celular del microbio, donde las enzimas descomponen el contaminante en fragmentos más pequeños. La degradación microbiana es de forma aeróbica, es un proceso donde el oxígeno es utilizado para oxidar el pesticida mientras que en la degradación anaeróbica el oxígeno no está presente, se produce a través de otra vía. En el suelo, la primera capa es aeróbica mientras que la de abajo es anaeróbica (Bansal, 2005, Pág. 19-27).

El proceso de biodegradación depende de algunos factores, de los cuales a continuación se analiza varios factores influyentes:

1. **Profundidad:** A profundidades más bajas, la tasa de metabolismo es más lenta por falta de oxígeno y a la temperatura.
2. **Movilidad:** al estar un pesticida ligado al suelo, o a la materia orgánica el proceso de biodegradación es más efectiva.
3. **Temperatura:** a mayor temperatura mayor tasa de degradación, al aumentar la temperatura se disminuye la sorción y la actividad metabólica aumenta.
4. **pH:** La degradación microbiana aumenta con el pH.
5. **Humedad del suelo:** las bacterias requieren gran cantidad de humedad para la degradación, la humedad (Waterlogged) grado de inundación o anegación, porcentaje.
6. **Materia orgánica y nutriente:** la degradación de pesticidas en suelos con abundante materia orgánica es más acelerado debido al cometabolismo.
7. **Pesticida:** La naturaleza química del pesticida y de su estado de agregación. La degradación de la fracción alifática es más rápida que la de los aromáticos. Las concentraciones tóxicas del pesticida inhiben la biodegradación. Finalmente, el estado de oxidación, mientras más alto sea más difícil es de biodegradar.
8. **Solubilidad.** Mientas más alta es la solubilidad del pesticida, más disponible está y consecuentemente más fáciles de biodegradar.



Según, Hoostal et al, 2002, los degradadores edáficos de pesticidas más importantes, pertenecen los géneros *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Fusarium*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Pseudomonas* y *Trichoderma*. *Alcaligenes* y *Pseudomonas*.

### 2.4.3. Rutas Metabólicas

Las rutas de degradación del clorpirifos en el suelo son aeróbicas y anaeróbicas. El metabolito, contenido de polifenoles totales (TPC), producto de la degradación de clorpirifos, persiste en el suelo de manera prolongada cuando no está expuesta a luz (EPA, 2006). En suelos alcalinos con condiciones de baja humedad, la principal ruta de degradación es hidrolítica, sin embargo se inhibe en concentraciones altas de clorpirifos (1000 µg/g) (Racke et al, 1996). En la figura 52, se representa el esquema básico del metabolismo de los organofosforados.

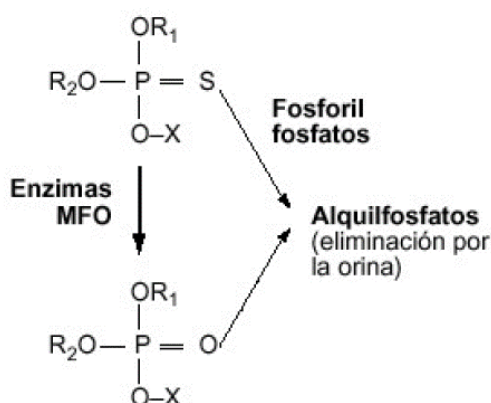


Figura 52. Esquema elemental del metabolismo de los organofosforados, papel de la MFO (Mixed Function Oxidase) y transformación final en alquilfosfatos.

### 2.4.4. Experiencias de degradación de pesticidas en Ecuador

Un estudio realizado en el cantón Pindal (Loja) en cultivos de maíz, identifico ocho géneros de hongos con potencial biorremediador para herbicidas de tipo glifosato: *Penicillium*, *Mucor*, *Scytalidium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Eurotiomycetes*, *Talaromyces* y *Fusarium* (Abad, 2017).

Paredes. 2017, evaluó la biodegradación de insecticidas en suelos de cultivos de papa en la provincia del Carchi e identifico que el mejor tratamiento fue usar *Trichoderma harzianum* en suelos contaminados por carbofurán, logro degradar

63% del pesticida en 57 días, en el estudio se utilizó una concentración del inoculo de *Trichoderma* fue de  $38.3 \times 10^6$  colonias/ml de solución, correspondiente a 4170.5  $\mu\text{g/g}$  de carbofurán.

Maldonado.2017, menciona que colocó 500 ml de pesticida organofosforados (Clorpirifos) con una concentración del 48%, donde resultó que el mejor tratamiento para degradar pesticidas fue emplear los hongos *Pleurothus ostreatus* y *Trichoderma harzianum*, las que tuvieron una eficiencia de 66.8% de remoción de clorpirifos, lo que equivale a 2710.09  $\mu\text{g/g}$ .

### 3. METODOLOGÍA

El presente proyecto se realizó de forma cualitativa-cuantitativa de forma experimental, para identificar bacterias en suelos contaminados de pesticidas capaces de degradar pesticidas y establecer su cinética de degradación. El presente estudio se basó en la relación que tienen las especies empleado (variable independiente) con la tasa de crecimiento, tasa de degradación y eficiencia (variables dependientes).

La primera parte de la investigación se basó en determinar los puntos de muestreo, dentro de la segunda etapa se realizó el aislamiento de bacterias de cultivos mixtos a puros, posteriormente se identificó la morfología empleado la Prueba de Tención Gram. Después, se seleccionó los microorganismos con mayor potencial de capacidad de degradación para pesticidas mediante ensayos de turbidez, en presencia del pesticida Lorsban 480. Posterior a eso, se realizaron pruebas bioquímicas para identificar el género de los microorganismos ensayados. Finalmente, se realizó los ensayos de degradación a condiciones establecidas, en presencia del mismo pesticida. Con los resultados se determinó la cinética de degradación de cada uno de los microorganismos empleados.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico con una prueba de normalidad de los datos en donde se empleó la prueba de SHAPIRO - WILLKS, en el programa INFOSTAT. Una vez obtenido los datos con comportamiento normal se analizó con pruebas de Tukey.

En la siguiente *Figura 53* se detalla el diagrama de flujo utilizado en el presente

proyecto, mostrando cada proceso y prueba realizada para las muestras.

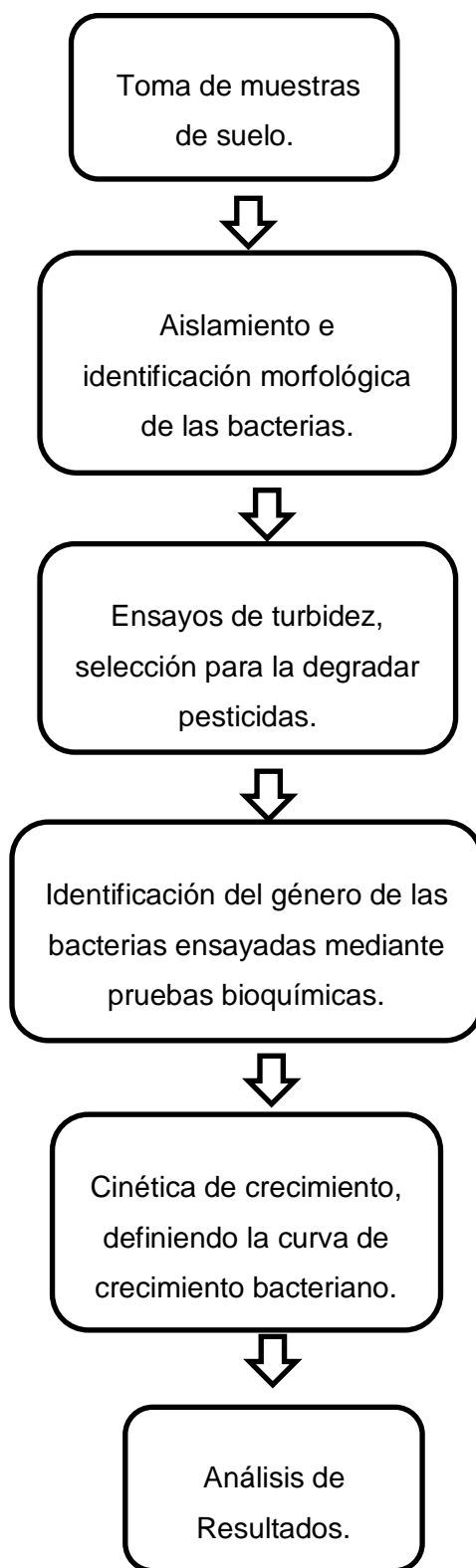


Figura 53. Diagrama de Flujo del procedimiento seguido en el proyecto.

### 3.1. Toma de muestra de suelo

Se realizó la toma de muestras (alícuotas) de suelo de la hacienda Santa Isabel de la parroquia rural Poaló (las que se escogieran en función de su volumen parroquia rural Poaló (las que se escogieran en función de su volumen de exportación), donde se tomará una muestra compuesta de las parcelas de la hacienda.

En la tabla 7 describe las coordenadas de los puntos de muestreo, así como una pequeña descripción de lugar de obtención de la muestra.

Tabla 7.

*Descripción de las muestras objeto de estudio.*

<b>Muestra</b>	<b>Punto de muestro</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Descripción</b>
M <sub>1</sub>	1	S 0° 52 15.2292 W 78° 39 23.0137	
	2	S 0° 52 11.6400 W 78° 39 21.8520	Cultivos de brócoli con 2 semanas de siembra.
	3	S 0° 52 13.4940 W 78° 39 24.0480	
	4	S 0° 52 13.8936 W 78° 39 20.7868	

---

		S 0° 52 15.9420	
	1	W 78° 39 17.5850	
		S 0° 52 14.0880	
M <sub>2</sub>	2	W 78° 39 18.7176	Cultivos de brócoli con 9 semanas de siembra.
		S 0° 52 12.2664	
	3	W 78° 39 18.5895	
		S 0° 52 14.7684	
	4	W 78° 39 13.6080	

---

		S 0° 52 09.9228	
	1	W 78° 39 26.3088	
		S 0° 52 10.8624	
M <sub>3</sub>	2	W 78° 39 22.8780	Cultivos de brócoli con 4 semanas de siembra.
		S 0° 52 12.4320	
	3	W 78° 39 24.6384	

---

		S 0° 52 09.1956	
	4	W 78° 39 24.2172	
<hr/>			
		S 0° 52 17.7024	
	1	W 78° 39 21.0240	
		S 0° 52 16.9212	
M <sub>4</sub>	2	W 78° 39 18.5184	Cultivos de brócoli con 12 semanas de siembra.
		S 0° 52 16.5648	
	3	W 78° 39 22.3704	
		S 0° 52 15.9276	
	4	W 78° 39 19.7820	
<hr/>			

Adicionalmente, en la *Figura 54* se presenta el área de muestra con imágenes reales del lugar de muestreo.



*Figura 54.* Esquema de muestreo de los puntos de recolección.

- a) Toma de muestras.
- b) Representan los 5 puntos de muestreo.
- c) Diferentes terrenos de donde se recolecto las muestras.

### 3.1.1. Tipo de muestreo

Para el muestreo de la hacienda, se definirán tres cuadrantes al azar en la parcela seleccionada para obtener una muestra compuesta, basándose en la norma ASTM C702, las dimensiones de los cuadrantes serán de 30m x 45m de los que se tomarán 5 sub-muestras por cuadrante, para un total de 25 sub-muestras, de las cuales se obtendrá una muestra compuesta representativa (Nacional & Azul, n.d.)



### 3.1.2. Toma de muestras

En la hacienda se seleccionó varios cuadrante, uno céntrico y cerca de la carretera así como al otro extremo; para la recolección de las sub-muestras se utilizó un barreno para conservar los agregados. Las sub-muestras serán tomadas de 0 a 15 cm de profundidad.



*Figura 55.* Procedimiento de toma de muestra.

### 3.1.3. Preparación de muestra compuesta

Para elaborar la muestra compuesta se tomó 5 sub-muestras por cada cuadrante de cada hectárea de cultivo de brócoli dando un total de 20 sub-muestras, para cada sub-muestra se procedió a vaciarla en un plástico negro para después mezclar todas las sub-muestras para homogeneizar y distribuir las en un círculo que será dividido en cuatro cuadrantes, después se procederá a eliminar los cuadrantes opuestos y se mezclará los dos sobrantes, este proceso se lo repetirá para obtener de un kilogramo de suelo.



*Figura 56.* Muestra compuesta mediante sistema de cuarteo.



### **3.2. Aislamiento bacteriano y siembra mediante diluciones**

Para la siembra se empleó la técnica de diluciones (Falkiewicz, Janda y Wypych, 2015). Para lo cual se tomarán 100 gramos de suelo y se disolverá en 1000 mililitros de agua destilada y se procederá en conformidad con la metodología.

Con el equipo Colony Counter Digital se realizó el conteo de UFCs, donde se simuló el cuarteo en la caja petri para el conteo del eje superior izquierdo, y así realizar el cálculo total de las colonias. Mientras que para la identificación de la diversidad de morfologías se hizo pruebas de Tinción de Gram, para luego observar en el microscopio e identificarlas morfológicamente.

#### **3.2.1. Obtención de cultivos puros**

Para obtener un cultivo puro se realizó mediante siembras sucesivas con la técnica de agotamiento de estría en placa petri.

La propagación de las cepas pura se hizo en 50ml medio de caldo nutritivo y se incubarán durante 72 horas a 27°C.

#### **3.2.2. Identificación de microorganismo**

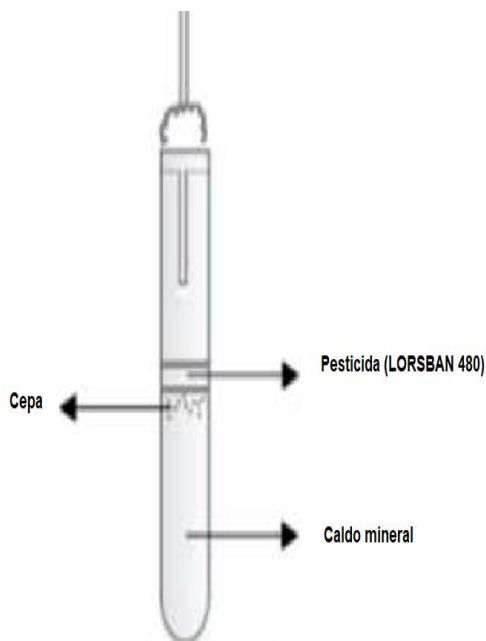
Se realizaron pruebas de tinción Gram las cuales se llevaron a cabo en el laboratorio, donde se utilizó violeta de genciana, Lugol, alcohol cetona y safranina, cada uno con un tiempo de espera de 1 minuto después se procede a limpiar con agua destilada. Posterior a este proceso se coloca la placa en el microscopio y se observa con el lente de menor aumento hasta llegar al de mayor e identificar la bacteria.

### **3.3. Determinación de la eficiencia de las especies aisladas**

Mediante pruebas de turbidez se inoculó 1ml de cada colonia individual en un tubo de ensayo con 9 mL de solución mineral (Difco Bushnell- Haas Broth) y 1 mL de pesticida (LORSBAN 480), se incubó los tubos durante 72 horas bajo 27°C. Toda muestra que presente turbiedad será considerada positiva y considerada para las pruebas de degradación.

### 3.3.1. Selección de cepas experimentales

Con las pruebas positivas se monitoreará la variación de la turbidez, midiendo Unidades Nefelométricas de turbidez (*NTU*), durante 7 días, se medirá los días 1 – 3 - 7. Finalizado el tiempo de ensayo, se seleccionó las bacterias con mayor tasa de turbidez, haciendo un promedio de los datos por cada bacteria.



*Figura 57.* Esquema de ensayo de turbidez usado para colonia por duplicado.

### 3.4. Identificación bioquímica

Para la identificación bioquímica se enviaron las 3 cepas completamente aisladas al laboratorio DISERLAB ubicado en la Universidad Pontífice Católica del Ecuador (PUCE).

Previo a esto se realizaron pruebas de oxidasa se utilizó las tiras reactivas de la marca HARD DIAGNOSTICS. , mientras que para la pruebas de catalasa se utilizó el porta objetos y agua oxigenada.

### 3.5. Pruebas de degradación de pesticidas

#### 3.5.1. Variable Independiente

Tabla 8.

*Diseño experimental.*

Factores	Niveles	Tratamientos	Repeticiones	
Especies	M1	T1: M1C1	2 (Erlenmeyer) x Tratamiento.	
	M2	T2: M1C2		
	M3	T3: M2C1		
		T4: M2C2		
	Concentración	C1		T5: M3C1
				T6: M3C2
	C2	T1: M1		
		T2: M2		

### 3.5.2. Variable Dependiente

Absorbancia  $\rightarrow$   $\mu$ m

Conteo microbiano  $\rightarrow$  UFC's

#### 3.5.2.1. Medición de absorbancia.

Se utilizó cubetas 1 cm de diámetro donde se coloca 1ml de la solución que se encuentra en el Erlenmeyer y se coloca en el equipo GENESIS 10S UV – VIS Spectrophotometer, a una longitud de onda de 300.

### 3.5.2.2. Conteo Microbiano

Para el conteo microbiano se utilizó el equipo Colony Counter Digital, se simuló un cuarteo en la caja petri, para realizar el conteo del cuadrante superior izquierdo, y posterior obtener el número total de las colonias existentes.

### 3.6. Medición de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos son: tasa de crecimiento microbiano, tasa de biodegradación, tiempo de vida media, eficiencia, los cuales están detallados a continuación.

#### 3.6.1. Determinación de la tasa de crecimiento

El crecimiento microbiano es el número unidades formadoras de colonia (UFC's) en función del tiempo, para su determinación se emplea la Ecuación 1 indicada a continuación:

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:  $\mu$ , es la tasa de crecimiento microbiano,  $N_1$  es el número de UFCs/ml al  $t_1$  de 4 horas,  $N_2$  es el número de UFCs/mL al  $t_2$  de 24 horas.

#### 3.6.2. Transformación de valores de absorbancia a concentración

Para el efecto se empleó la fórmula de Lamber- beer. Para determinar los valores se emplea la ecuación 2.

$$A = \varepsilon * C * l \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

$\varepsilon$ : Constante de absorbancia específica

A: es absorbancia

C: concentración

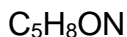
l: Longitud de la celda.

Para los cálculos se tomó en cuenta la fórmula celular y la fórmula del pesticida:

- Fórmula del pesticida.

$C_9H_{11}CL_3NOPS$

- Fórmula celular:



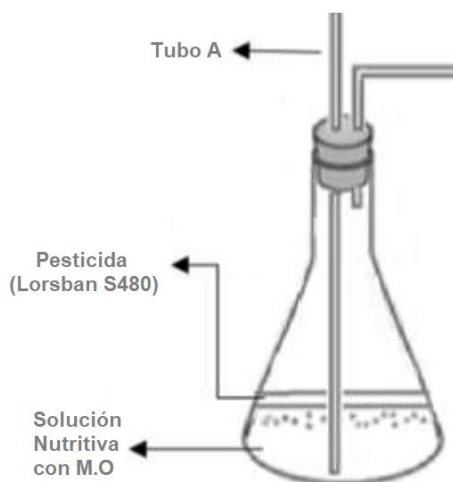
Los cálculos se detallan en los anexos 4-5-6.

### 3.6.3. Determinación de la tasa de degradación

Es un parámetro específico de cada cepa, refleja la velocidad con que el microorganismo degrada el contaminante (pesticida), es decir, la cantidad de contaminante que se elimina en una unidad de tiempo. La tasa de degradación se calcula por la fórmula modificada de Monod, considerando el proceso como una reacción de primer orden. Para determinar la tasa de degradación se emplea la ecuación 3.

$$\frac{\ln C_0}{c} = K * t \quad (\text{Ecuación 3})$$

A continuación, se presenta un esquema de los ensayos utilizados para cada cepa bacteriana.



*Figura 58.* Esquema del ensayo de degradación usado para cada bacteria seleccionada por duplicado.

**Tubo A:** Toma de muestra para la determinar la tasa de crecimiento bacteriano y para medir al absorbancia.

Del Tubo A se tomó un volumen de 5 µL y se sembró en agar nutritivo, se dejó incubar por 24 horas para el conteo de colonias presente. Dicho proceso se realizó durante 30 días, se tomó muestra a las 4 y 24, horas, al día 15 y al día 30.

#### **3.6.4. Determinación de tiempo de vida media**

Determina el tiempo necesario para consumir el 50 % de la concentración del pesticida. Para lo cual se empleará la ecuación 4 mostrada a continuación:

$$\frac{t1}{2} = \frac{-\ln(0.5)}{k} * t \quad (\text{Ecuación 4})$$

Dónde:  $t_{1/2}$  es el tiempo de vida media.

K es la tasa de degradación.

#### **3.6.5. Determinación de la eficiencia en porcentajes**

La eficiencia es un parámetro empleado para conocer la capacidad de la bacteria en degradar el pesticida a lo largo de un tiempo, se mide en porcentaje. Para ello se empleará la siguiente ecuación 5:

$$y = \frac{cf * 100}{co} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Dónde: *cf* es la concentración final, *co* es la concentración inicial.

### **3.7. Análisis de resultados**

Para analizar los resultados se utilizará el programa estadístico INFOSTAT, el análisis de varianza se utiliza para demostrar la variación de datos de un solo lote o entre varios, se determina la significancia y demostrar que los datos tienen diferencias dependiendo de las variables y constantes encontradas en el experimento (Faraway, 2002).

Para el estudio se utilizó el programa antes mencionado, donde se identificó las diferencias significativas entre los tratamientos (cepas), complementando con pruebas Normalidad (Shapiro - Wilk) y con pruebas de Tukey.




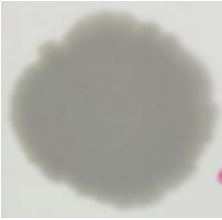


## 4. RESULTADOS

### 4.1. Colonias identificadas

De las tres siembras realizadas se obtuvieron un total de 15 colonias de las cuales solo doce tenían morfología diferente.

Tabla 9.

*Identificación de las 15 cepas.*

CEPA	FOTO
A	
B	
C	
D	
E	
F	



---

El número bajo de colonias obtenidas durante las siembras puede estar relacionado con el nivel de pH del suelo, el valor medido del suelo estudiado, fue de 4 que corresponde a un pH ácido. El pH del medio afecta directamente al crecimiento microbiano (Zak, 1973).



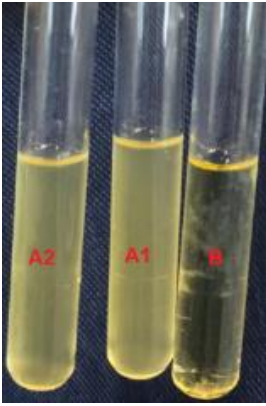
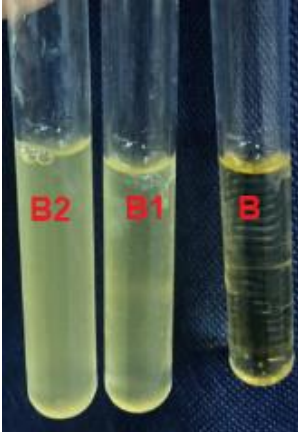
Fernández et al., 2011 menciona que el pH alcalino es esencial para lograr la degradación de Clorpirifós. Los microorganismos tienen la capacidad de tolerar factores ambientales extremos, altas temperaturas o bajos pH, pero no las dos al mismo tiempo.

#### 4.2. Pruebas de Turbidez

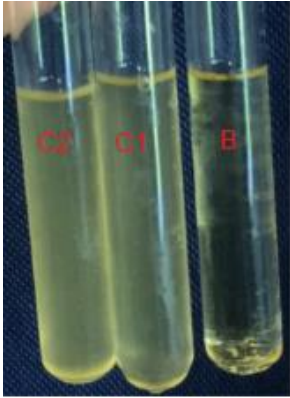
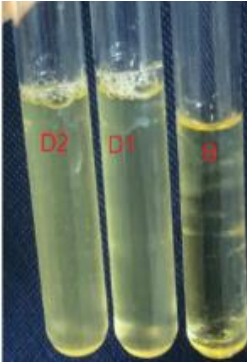
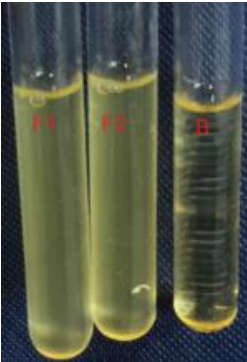
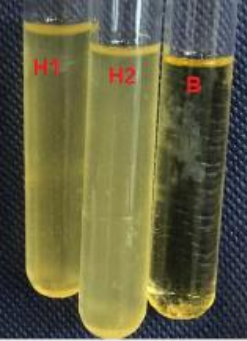
Resultados de Turbidez de las siete cepas seleccionadas.

Tabla 10.

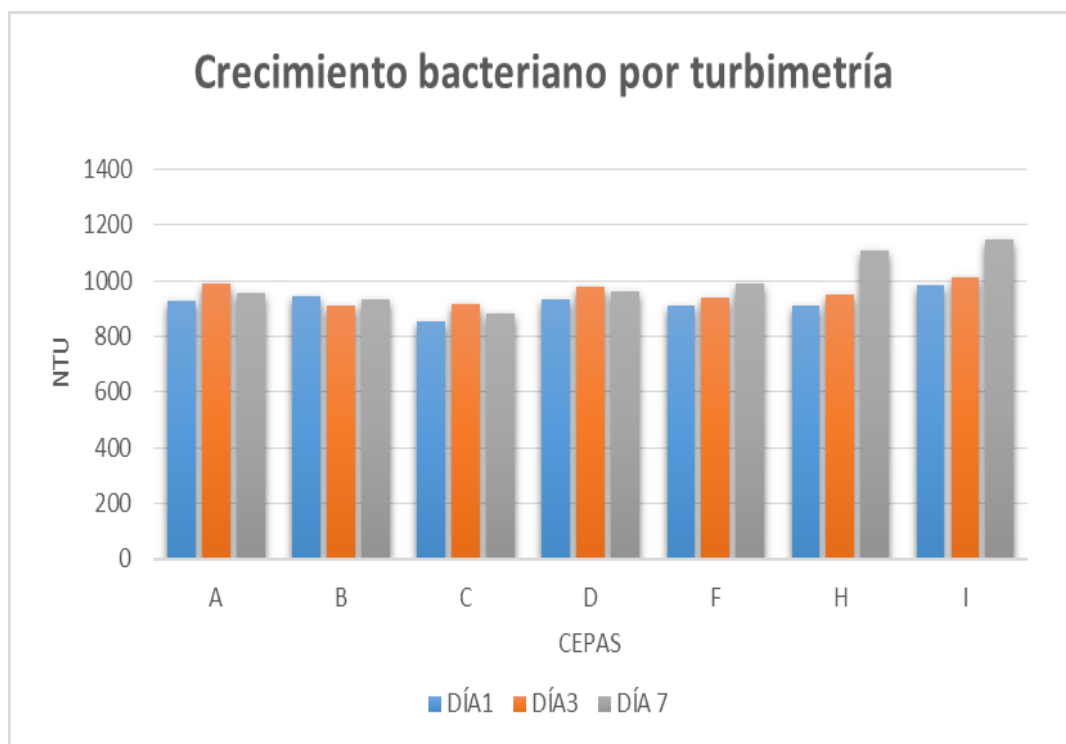
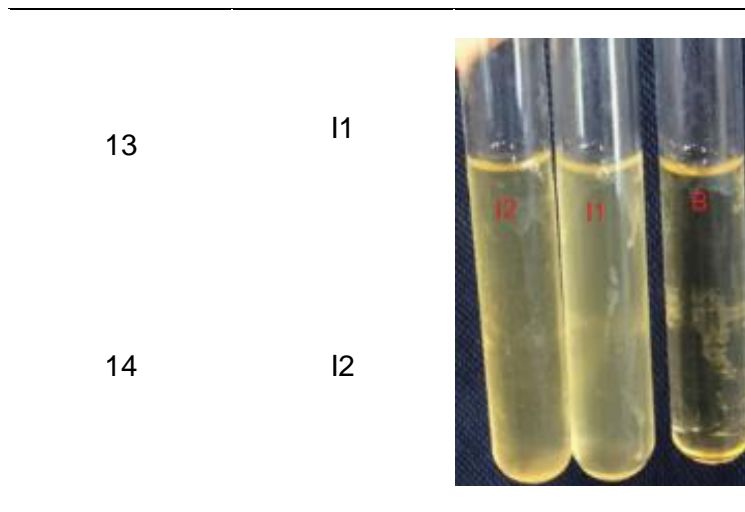
*Resultados de turbidez a los 7 días.*

No.	Cepa	Foto
1	A1	
2	A2	
3	B1	
4	B2	

---

5	C1	
6	C2	
7	D1	
8	D2	
9	F1	
10	F2	
11	H1	
12	H2	

---


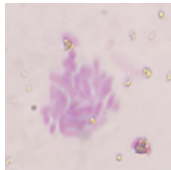
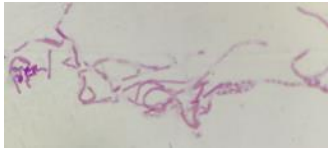
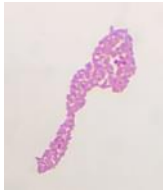
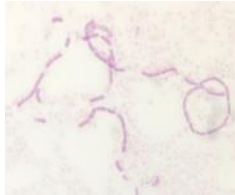



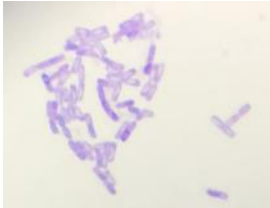
*Figura 59.* Crecimiento bacteriano de las especies seleccionadas

Los resultados obtenidos evidencian que la capacidad de degradar pesticidas organofosforados como el clorpirifos, en suelos afectados dedicados al cultivo de brócoli es común por cuanto, del total de cepas aisladas; el 58,3% de ellas mostraron la capacidad de degradarlo.

Tabla 11.

*Tinción de las cepas seleccionadas.*

Referencia Colonia	Dilución	Morfología	Tinción Gram	Foto
Colonia A	$1 \times 10^{-3}$	Bacilos	-	
Colonia B	$1 \times 10^{-3}$	Coco Bacilos	-	
Colonia C	$1 \times 10^{-3}$	Estrepto bacilos Esporulados	-	
Colonia D	$1 \times 10^{-3}$	Micro bacilos	-	
Colonia F	$1 \times 10^{-3}$	Bacilos No esporulados	+	

Colonia H	$1 \times 10^{-3}$	Estrepto bacilo	+	
Colonia I	$1 \times 10^{-3}$	Bacilos esporulados	+	

Fueron seleccionadas las cepas F, H e I, debido a que representaron los mayores valores de turbidez.

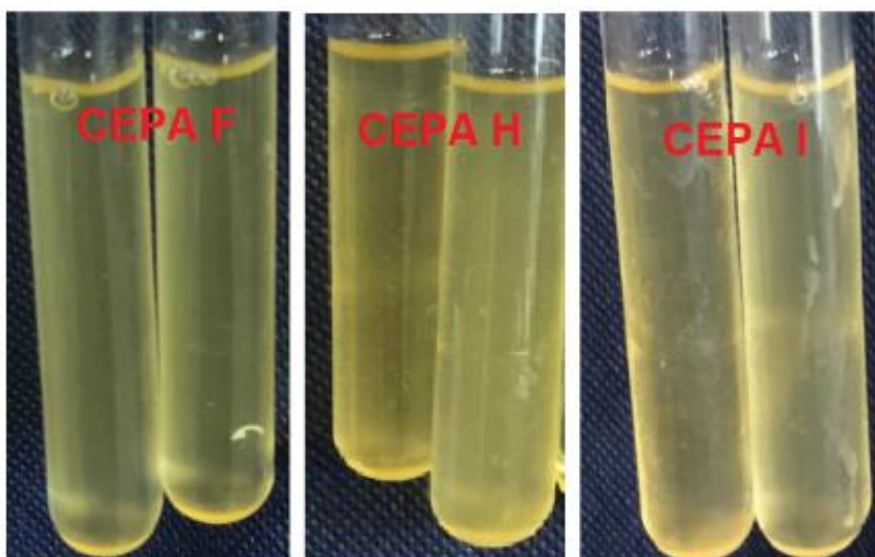


Figura 60. Cepas con mayores valores de turbidez.

#### 4.3. Características bioquímicas e identificación de las especies

Se ejecutaron las pruebas de oxidas y catalasa, dando los siguientes resultados para la prueba de catalasa: positivos para las cepas F y H, mientras que la cepa

I fue negativa. En cambio, en la prueba de oxidasa las cepas H e I resultaron positivas pero la cepa F fue negativa.

Tabla 12.

*Taxonomía de las cepas (informe del laboratorio DISLAB).*

	<b>Cepa F</b>	<b>Cepa H</b>	<b>Cepa I</b>
<b>Dominio</b>	Bacteria	Bacteria	Bacteria
<b>Filo:</b>	Proteobacteria	Firmicutes	Firmicutes
<b>Clase:</b>	Gammaproteobacteria	Bacilli	Bacilli
<b>Orden:</b>	Pseudomonadales	Bacillales	Bacillales
<b>Familia:</b>	Pseudomonasaceae	Bacillaceae	Bacillaceae
<b>Género:</b>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
<b>Especie:</b>	<i>especies</i>	<i>cereus</i>	<i>thuringiensis</i>

### **Colonia F (*Pseudomonas sp.*)**

*Pseudomonas sp.*, son aeróbicas estrictas por ende su metabolismo depende del oxígeno o en ciertos casos del nitrógeno, su reacción es positiva ante la prueba de catalasa, pueden crecer a temperatura que oscila entre los 28° C y 45° C y con pH de crecimiento puede ser menor a 4.5, varias ocasiones se presentan en forma de cadena, sin embargo casi siempre están solas o en parejas (Brenner, Krieg, & Staley, págs. 323-329).

La información mencionada coincide con lo realizado, el ensayo de degradación, donde se realizó un sistema aeróbico llevado a 37° C, la prueba de oxidasa es positiva, catalasa es negativa, la tinción fue Gram Positiva (Brenner, Krieg & Staley, págs. 323-329).

#### **Colonia H (*Bacillus Cereus*)**

*Bacillus cereus*, son bacterias anaeróbicas facultativas, Gram positivas o Gram negativas, Catalasa positivas, oxidasa-negativas, el crecimiento óptimo es a 37 °C, según, Vessey y Buss (2002), *Bacillus cereus* estimula la nodulación en las leguminosas, lo que mejora la fijación de nitrógeno por *bradyrhizobium*.

Las pruebas bioquímicas ejecutadas durante esta investigación confirman la información, por cuanto, la tinción Gram fue Positiva, catalasa positiva y oxidasa negativa (Bergey's.1978).

#### **Colonia I (*Bacillus thuringiensis*)**

Son bacterias anaerobias facultativas, Gram positivas, se presentan de forma individual, en pares y cadenas. También forman esporas elipsoidales, a veces cilíndricas, parecentales. Crecen en el rango de 10–15 ° C, y la máxima de 40–45 ° C, son oxidasa negativas y catalasa positivas (Bergey's.1978).

Estos parámetros, concuerdan con los datos experimentales, que muestran una prueba de Gram positiva, oxidasa negativa y catalasa positiva, en tanto que el crecimiento se llevó a cabo a una temperatura de 37° C.

#### **4.4. Pruebas de degradación**

Las constantes de absorbancia específica de las cepas F, H e I son:

F= 0,43

H= 0,32

I= 0,38

Tabla 13.

Variación de la absorción en unidades experimentales.

Día	<i>Pseudomonas sp.</i>		<i>Bacillus Cereus</i>		<i>Bacillus thuringiensis</i>		Blanco	
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
1	0.840	0.839	2.401	2.805	0.830	0.770	0.173	0.329
3	2.458	2.592	3.425	3.549	2.184	1.824	0.241	0.462
6	3.607	3.175	3.832	3.706	3.517	2.817	0.254	0.517
9	3.842	3.512	3.881	3.920	3.845	3.399	0.261	0.544
12	3.870	3.651	3.932	3.842	3.891	3.615	0.285	0.551
15	3.883	3.723	3.790	3.809	3.840	3.715	0.341	0.537
18	3.884	3.826	3.724	3.990	3.932	3.685	0.391	0.550
21	3.882	3.842	3.869	3.861	3.702	3.714	0.350	0.530
24	3.877	3.812	3.869	3.920	3.737	3.712	0.357	0.571
27	3.822	3.983	3.904	3.790	3.773	3.861	0.388	0.603
30	3.901	3.711	2.401	2.805	3.622	3.646	0.413	0.638

En la *tabla 13*, muestra la absorbancia medida para la concentración de 800 ppm durante día 30 con intervalos de 3 días, donde los días con mayor absorbancia registrada fue el día 30 con 3.905 para *Pseudomonas sp.*, en el día 12 con 3.932 para *Bacillus cereus*, y el día 18 con 3.932 para *Bacillus thuringiensis*, mientras que para la concentración de 1600 ppm la mayor degradación fue para *Bacillus cereus* el día 18 con 3.390, mientras que para *Pseudomonas sp.*, fue de 3.983 y para *Bacillus thuringiensis* fue de 3.861.

Dónde:



C1 corresponde a la concentración de 800ppm

C2 corresponde a la concentración de 1600 ppm

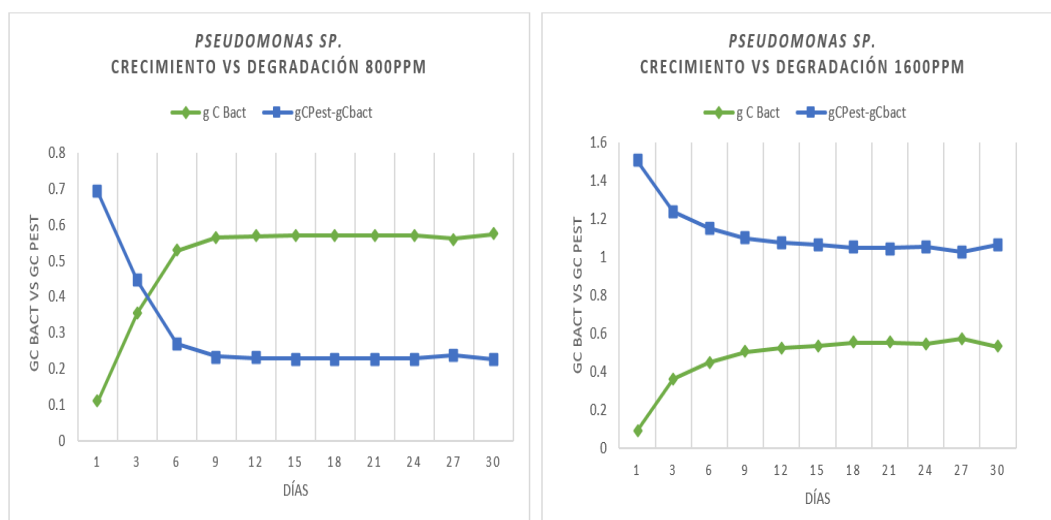
Los cálculos determinan un descenso de la concentración del pesticida en conformidad con la Tabla 14.

Tabla 14.

*Descenso de la concentración del pesticida en g.*

DÍA	<i>Pseudomonas sp.</i>		<i>Bacillus Cereus</i>		<i>Bacillus thuringiensis</i>		Blanco	
	C <sub>1(g)</sub>	C <sub>2(g)</sub>	C <sub>1(g)</sub>	C <sub>2(g)</sub>	C <sub>1(g)</sub>	C <sub>2(g)</sub>	C <sub>1(g)</sub>	C <sub>2(g)</sub>
1	0.692	1.505	0.671	1.482	0.679	1.504	0.615	1.225
3	0.413	1.238	0.335	1.070	0.446	1.322	0.603	1.201
6	0.263	1.149	0.126	0.918	0.217	1.151	0.601	1.192
9	0.236	1.098	0.043	0.886	0.160	1.051	0.599	1.187
12	0.228	1.077	0.033	0.842	0.152	1.014	0.592	1.184
15	0.231	1.066	0.022	0.858	0.161	0.997	0.585	1.189
18	0.235	1.050	0.051	0.864	0.145	1.002	0.576	1.186
21	0.224	1.048	0.065	0.827	0.185	0.997	0.583	1.190
24	0.231	1.052	0.035	0.854	0.179	0.998	0.583	1.182
27	0.237	1.026	0.035	0.842	0.172	0.972	0.577	1.177
30	0.222	1.068	0.028	0.869	0.198	1.009	0.572	1.170

En la *tabla 12*, muestra el descenso de la concentración del pesticida con una concentración de 800 ppm fue de 0.222 para *Pseudomonas sp.*, fue de 0.028 para *Bacillus cereus*, y 0.198 para *Bacillus thuringiensis*, para concentraciones de 1600 ppm el descenso de la degradación fue para *Bacillus cereus* fue de 0.869, mientras que para *Pseudomonas sp.*, fue de 1.068 y para *Bacillus thuringiensis* fue de 1.009.



*Figura 61.* Tasa de crecimiento de la bacteria en gramos frente a la degradación de pesticidas en gramos de la bacteria *Pseudomonas sp.*

En la figura 61 se muestra la comparación de las concentraciones del pesticida empleado, donde para 800 ppm el crecimiento bacteriano es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende la bacteria *Pseudomonas sp.*, es eficiente para la degradación del pesticida. Sin embargo para concentración de 1600 ppm el crecimiento bacteriano no es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende la bacteria *Pseudomonas sp.*, no tiene la capacidad de degradar concentraciones altas como es la de 1600 ppm.

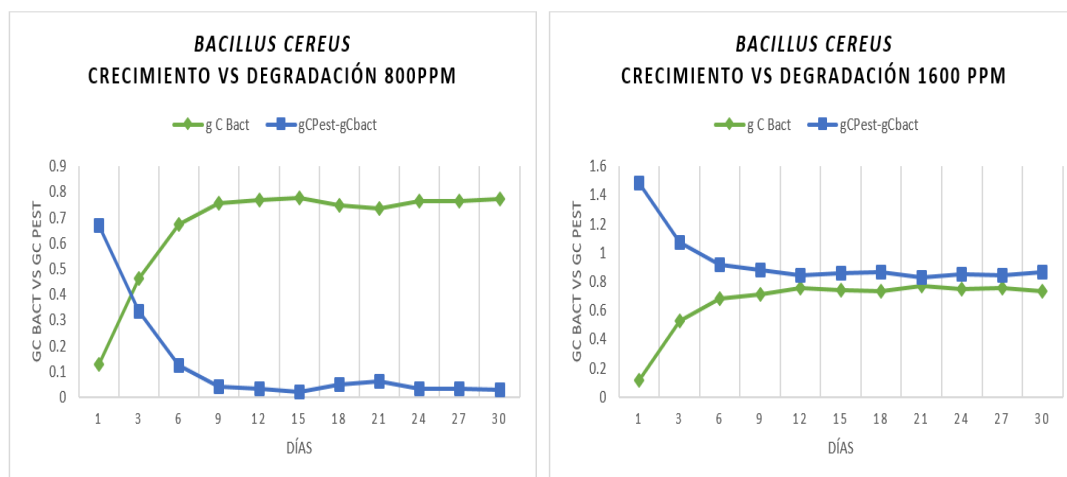


Figura 62. Tasa de crecimiento de la bacteria en gramos frente a la degradación de pesticidas en gramos de la bacteria *Bacillus cereus*.

En la figura 62 se muestra la comparación de las concentraciones del pesticida empleado, donde para 800 ppm el crecimiento bacteriano es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende la bacteria *Bacillus cereus*, es eficiente para la degradación del pesticida. Sin embargo para concentración de 1600ppm el crecimiento bacteriano no es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende la bacteria *Bacillus cereus*, no tiene la capacidad de degradar concentraciones altas como es la de 1600ppm.

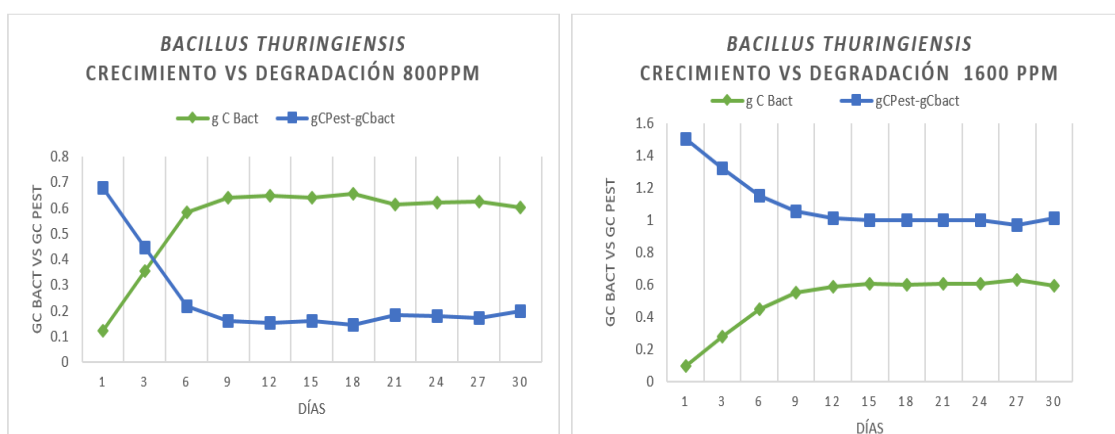
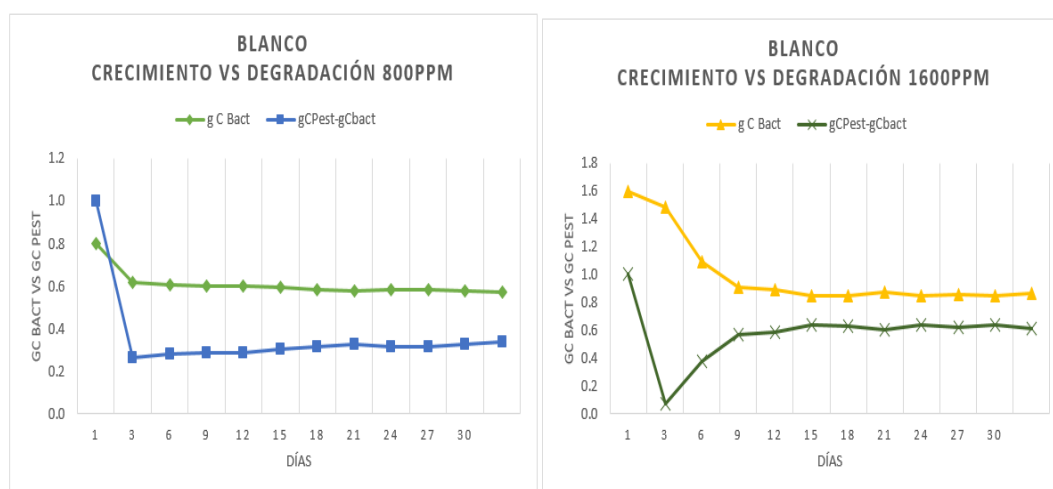


Figura 63. Tasa de crecimiento de la bacteria en gramos frente a la degradación de pesticidas en gramos de la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

En la figura 63 se muestra la comparación de las concentraciones del pesticida empleado, donde para 800 ppm el crecimiento bacteriano es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende la bacteria *Bacillus thuringiensis*, es eficiente para la degradación del pesticida. Sin embargo para concentración de 1600ppm el crecimiento bacteriano no es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende la bacteria *Bacillus thuringiensis*, no tiene la capacidad de degradar concentraciones altas como es la de 1600ppm.



*Figura 64.* Tasa de crecimiento de las bacterias en gramos frente a la degradación de pesticidas en gramos – Blancos.

En la *figura 64* se muestra la comparación de las concentraciones del pesticida empleado, donde para 800 ppm el crecimiento bacteriano es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida sin embargo es baja debido a que se usó un consorcio bacteriano, si hay degradación. Sin embargo para concentración de 1600ppm el crecimiento bacteriano no es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende el consorcio bacteriano no tiene la capacidad de degradar concentraciones altas como es la de 1600ppm.

Una vez comparada las gráficas de la concentración de 800ppm, *Bacillus cereus* una tasa de crecimiento de 3.907 mientras que la degradación es de 0.110,

mientras que la bacteria *Bacillus thuringiensis* el crecimiento fue de 3.905 pero no su degradación es de 0.039 y por último la bacteria *Pseudomonas sp.*, tuvo un crecimiento de 3.891 y su degradación fue de 0.042.

Pese a que no se obtuvo una degradación completa debido a que la concentración del pesticida es muy alta, *Bacillus cereus* una tasa de crecimiento de 3.919 mientras que la degradación es de 0.018, mientras que la bacteria *Bacillus thuringiensis* el crecimiento fue de 3.983 pero no su degradación es de 0.011 y por último la bacteria *Pseudomonas sp.*, tuvo un crecimiento de 3.861 y su degradación fue de 0.013.

#### 4.5. Determinación de datos cinéticos

##### 4.5.1. Tasa de crecimiento

Tabla 15.

*Tasas de crecimiento comparativo ( $\mu$ ).*

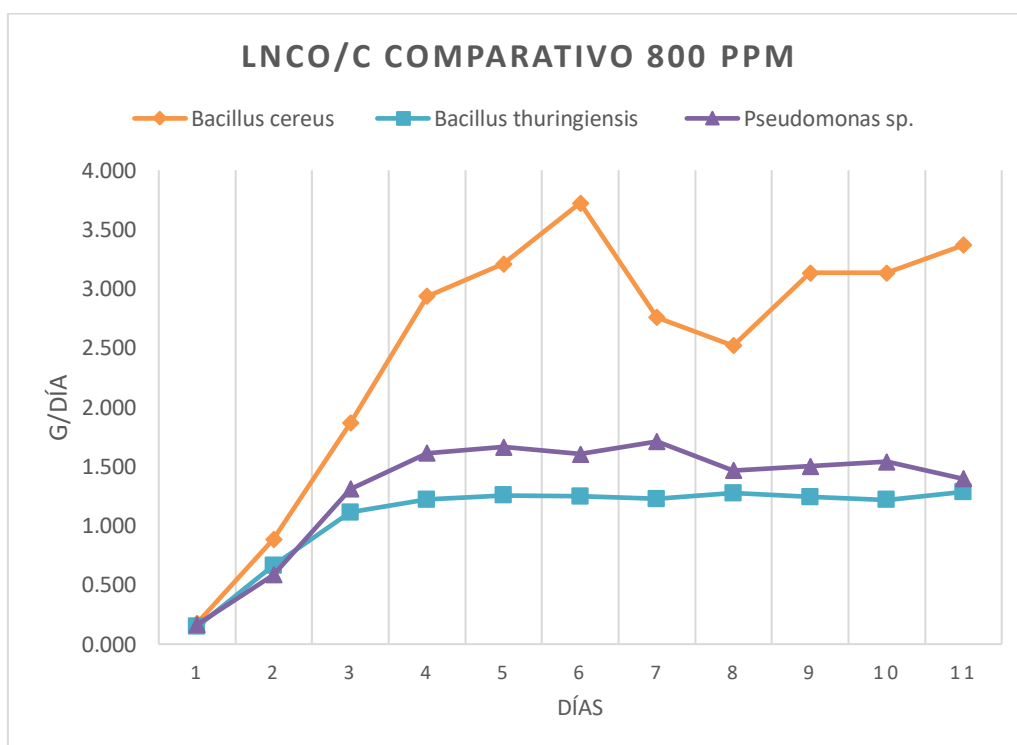
Especies	4horas	24 horas	lnN <sub>1</sub>	lnN <sub>2</sub>	$\mu$
<i>Pseudomonas sp.</i>	61	244	4.11	5.50	0.26
<i>Bacillus cereus</i>	59	360	4.08	5.89	0.29
<i>Bacillus thuringiensis</i>	9	29	2.20	3.37	0.15
Blanco	7	46	1.95	3.83	0.18

En el estudio realizado por Castañeda en el 2016, menciona que *Bacillus cereus* se incubo durante 24 horas y se obtuvo un crecimiento de 300 colonias, estos datos son similares a los obtenidos durante este estudio, donde se obtuvo 360.

De manera similar Arrieta et al (2004), analizo *Bacillus thuringiensis* incubándola por 24 horas obteniendo en el conteo 300 colonias, mientras que los resultados mostrados en la tabla 12 son inferiores, esto puede deberse a la combinación del pH con otras variables, como la disponibilidad de nutrientes (Ca, Mg, K), el

contenido de arcillas y la textura del suelo, las variables más importantes (Maduell et al. 2005).

El estudio de Santillana. (2006), de producción de biofertilizantes con una especie *Pseudomonas sp.*, reproducida en agar sacarosa, e incubada durante 24 horas, muestra que el crecimiento es mínimo, con apenas 5 colonias, mientras que durante esta investigación muestran un crecimiento de 244 colonias.



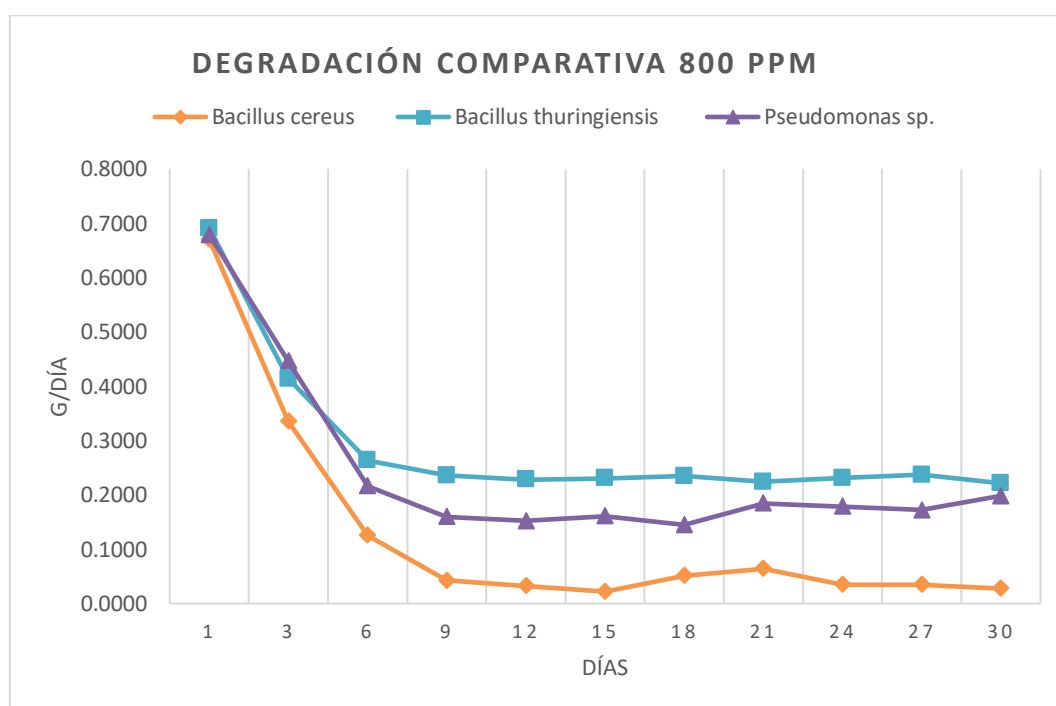
**Figura 65.** Tasa de crecimiento de la bacterias empleadas para la concentración 800ppm.

El crecimiento microbiano bajo la concentración de 800ppm, *Bacillus cereus* tiene un crecimiento de 3.369 g/día, *Pseudomonas sp.*, para el crecimiento fue de 1.396 g/día y por último la bacteria *Bacillus thuringiensis* tuvo un crecimiento de 1.285 g/día.



0.23 6	1.22 2	1.08 1	0.39 3	0.04 3	2.93 6	0.88 6	0.59 2	0.16 0	1.61 1	1.05 1	0.42 1	0.59 9	0.28 9	0.89 2	0.58 4
0.22 8	1.25 5	1.06 4	0.40 8	0.03 3	3.20 9	0.84 2	0.64 3	0.15 2	1.66 2	1.01 4	0.45 7	0.59 2	0.30 1	0.84 5	0.63 8
0.23 1	1.24 6	1.06 1	0.41 1	0.02 2	3.72 4	0.85 8	0.62 4	0.16 1	1.60 5	0.99 7	0.47 4	0.58 5	0.31 3	0.85 2	0.63 1
0.23 5	1.22 7	1.04 2	0.42 9	0.05 1	2.75 8	0.86 4	0.61 6	0.14 5	1.71 1	1.00 2	0.46 8	0.57 6	0.32 8	0.87 4	0.60 5
0.22 4	1.27 4	1.04 4	0.42 7	0.06 5	2.52 0	0.82 7	0.66 0	0.18 5	1.46 7	0.99 7	0.47 3	0.58 3	0.31 6	0.84 3	0.64 0
0.23 1	1.24 3	1.04 7	0.42 4	0.03 5	3.13 4	0.85 4	0.62 9	0.17 9	1.50 1	0.99 8	0.47 3	0.58 3	0.31 7	0.85 8	0.62 3
0.23 7	1.21 6	1.02 4	0.44 7	0.03 5	3.13 4	0.84 2	0.64 3	0.17 2	1.53 9	0.97 2	0.49 9	0.57 7	0.32 7	0.84 5	0.63 9
0.22 2	1.28 5	1.06 9	0.40 4	0.02 8	3.36 9	0.86 9	0.61 2	0.19 8	1.39 6	1.00 9	0.46 2	0.57 2	0.33 5	0.86 7	0.61 3

A continuación se muestra las gráficas de tasa de degradación de las especies empleadas.

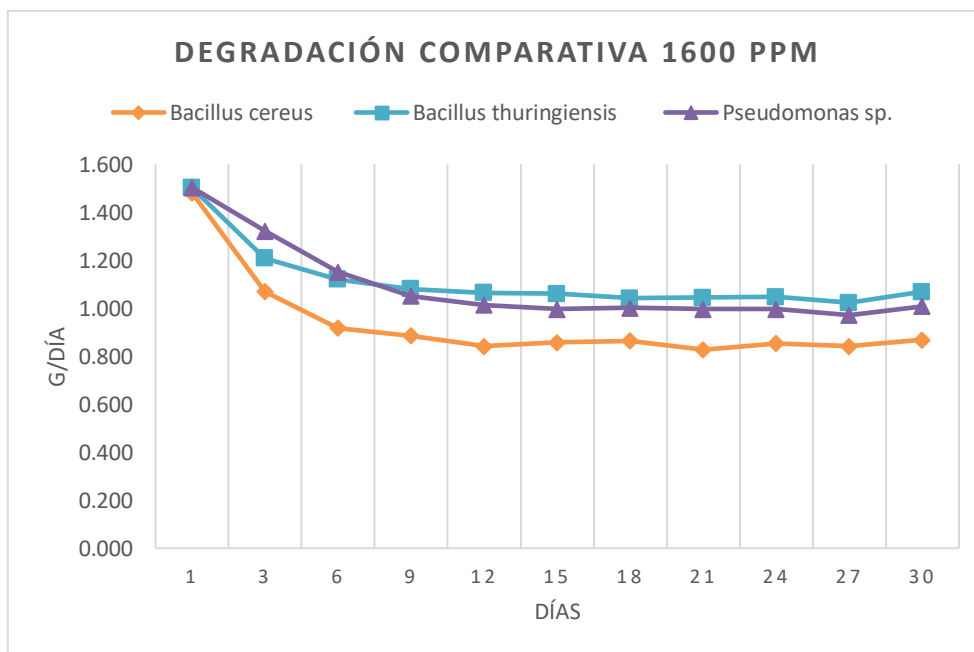


**Figura 67.** Tasa de degradación comparativa de las bacterias empleadas bajo la concentración 800 ppm.

La experimentación muestra que *Bacillus cereus*, es la de mayor tasa de degradación de clorpirifos con 0,110 g/día, en tanto que entre las bacterias



*Pseudomona sp.*, y *Bacillus thuringiensis*, no se observan diferencias significativas; 0,039 y 0,042 g/día, respectivamente; bajo la concentración de 800 ppm.



**Figura 68.** Tasa de degradación comparativo de las bacterias empleadas con la concentración 1600 ppm.

Mientras que bajo concentración 1600 ppm, *Bacillus cereus*, presenta una tasa de 0,868 g/día y *Pseudomona sp*, *Bacillus thuringiensis* 1.07 y 1.009 g/día respectivamente.

Tabla 17.

*Tasas de degradación de pesticidas comparativas (k)*

	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Bacillus Cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Blanco
800 PPM	0.039	0.110	0.0425	0.0025
1600 PPM	0.012	0.019	0.0138	0.0186

### 4.5.3. Tiempo de vida media

Tabla 18.

*Tiempo de vida media presentada en días.*

	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Blanco
800 PPM	17.66	6.3	16.32	281.53
1600 PPM	59.13	37.62	50.6	37.27

Los tiempos de vida media de un contaminante, son relevantes para determinar el tiempo necesario para su degradación o necesarios para que su concentración se reduzca a niveles inferiores a los establecidos en la legislación ambiental. Para *Bacillus cereus* la degradación completa del clorpirifos (800ppm), es de 56.7 días; en tanto que para degradar 1600ppm, se requieren 338.58 días.

Para *Pseudomona sp.*, y *Bacillus Thuringiensis*; los tiempos necesarios son 158.94 y 146.88 días, bajo 800ppm, y bajo 1600 ppm 532.17 y 455.4 días, respectivamente.

### 4.5.4. Eficiencia

Tabla 19.

*Eficiencia de las especies empleadas.*

	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Blanco
800 PPM	72.32%	96.54%	75.24%	28.45%
1600 PPM	33.18%	45.73%	37.05%	45.33%

La eficiencia de la degradación de *Bacillus cereus*, es de 96.53%, bajo la concentración de 800ppm, en tanto que bajo 1600ppm es de 45.73%. Estudios realizados por Z. Y. Liu. (2012), demuestran que *Bacillus cereus* tiene un porcentaje de eficiencia de degradación de clorpirifos de 78.85%, bajo la temperatura 30°C y al bajar la temperatura a 25 °C, la eficiencia es de 75.76%.

Estos datos son menores a los encontrados por nosotros, sin embargo; hay que resaltar que estas pruebas se obtuvieron bajo concentraciones de 100 ppm y que al pasar a 150 ppm el rendimiento bajo a 37.59%. Nuestras pruebas, se ejecutaron bajo concentraciones de 800 y 1600ppm.

Para las cepas *Pseudomona sp.*, y *Bacillus thuringiensis*, son de 72.32 y 75.23% bajo C<sub>1</sub>; y bajo C<sub>2</sub> 33,17 y 36.96% respectivamente.

El estudio realizado por Wu. 2013, muestra que *Bacillus Thuringiensis*, degrada clorpirifos con una concentración de 100 ppm, en 24 horas con una eficiencia de 83.94%, llegando a 88.99% a las 48 horas. La degradación de clorpirifos en el suelo con *Bacillus Thuringiensis*, tiene una eficiencia del 83.1%, bajo un pH 7.2, y una temperatura de 30 °C. (Aceves, 2015, Pág.213-219).

La cepa *Pseudomona sp.*, degrada clorpirifos bajo un pH de 8, con una concentración de 100ppm, a una temperatura de 28°C, en un tiempo de 120 horas, con una eficiencia del 84%, en tanto que a 168 horas con una eficiencia de 91,7% (Singh.2009). Estos resultados son cercanos a los valores obtenidos en nuestro estudio con relación a la eficiencia, sin embargo; en el tiempo es menor al nuestro.

Otros microorganismos capaces de degradar clorpirifos en medio liquido pertenecen a los géneros: *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Lebsiella*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Serratia* y *Synechocystis* (Ghanem et al., 2007; Surekha et al., 2008; Xu et al., 2007; Madhuri & Rangaswamy, 2009; Awad et al., 2011; Singh et al., 2011, Pág 2855-2862.). Especies bacterianas en las cuales se ha identificado la capacidad de degradar clorpirifos, son las bacterias *Vigna unguiculata*, *Achromobacter sp.*, *Ochrobactrum sp.* *Achromobacter xylosoxidans* y *Ochrobactrum sp* (Akbar.2016). La cepa *Bacillus sp*, degrada clorpirifos con una eficiencia del 97% en periodos de 120 horas (Bhatia, 2010, Pág. 104-109).

*Bacillus pumilus*, puede degradar altas concentraciones del pesticida clorpirifos, de 900ppm en 14 días (Anwar et al. 2009), mientras que *Streptomyces*

*chattanoogensis* puede degradar 50 ppm en tan solo 24 horas (Briceño et al. 2012).

La capacidad de degradar clorpirifos, también se ha detectado en hongos, así Bumpus et al. (1993) en su estudio, señala que el hongo *Phanerochaete chrysosporium* degrada clorpirifos en medio líquido, con una eficiencia del 27.5% durante un periodo de incubación de 18 días. En suelos dedicados al cultivo de banano, *Phanerochaete chrysosporium*, degrada muy bien clorpirifos (Lopera, 2004).

#### 4.6. Análisis estadístico

Los datos analizados en la prueba de Normalidad son normales.

Tabla 20.

*Pruebas de Shapiro – Wilks (Normalidad).*

Variable	N	Media	D.E	W*	p (Unilateral D)
Degradación	14	1.15	1.02	0.73	< 0.0001

Tabla 21.

*Análisis de Resultados*

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Cv
Degradación	14	1.00	0.99	6.71

Tabla 22.

*Cuadro de significancia de la Varianza (SC tipo III).*

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13.43	7	1.92	319.69	<0.0001
Tratamiento	13.39	6	2.23	371.90	<0.0001
Especie	0.00	0	0.00	sd	Sd
Error	0.04	6	0.01		
Total	13.47	13			

Tabla 23.

*Tukey de Cepas.*

**Alfa= 0.05 DMS= 0.10946**

**Error: 0.0060 gl: 6**

Especies	Medias	n	E.E	
Sin Especie	0.47	2	0.05	A
<i>Pseudomonas sp.</i>	0.84	4	0.04	B
<i>Bacillus thuringensis</i>	0.93	4	0.04	B
<i>Bacillus cereus</i>	2.03	4	0.04	C

Tabla 24.

*Tukey de Tratamientos.*

**Alfa= 0.05 DMS= 0.10946**

**Error:** 0.0060      gl: 6

Tratamientos	Medias	N	E.E	
2	0.40	2	0.05	A
6	0.46	2	0.05	A
4	0.69	2	0.05	A
1	1.28	2	0.05	B
5	1.40	2	0.05	B
3	3.37	2	0.05	C

Debido a que el  $p$  valor para las pruebas son significativos  $>0,05$ ; se acepta la hipótesis Nula que menciona que la tasa de degradación de pesticidas organofosforados depende de la especie microbiana empleada. Los factores a analizados fueron: especie y tratamientos.

En el análisis de varianza se muestra que si hay diferencia significativa para el factor especie, sin embargo; la escala de valores es muy baja que el programa no los analiza, mientras que en la variable tratamiento si existen valores significativos.

El coeficiente de variación es de 6.71, lo que indica los resultados son favorables puesto que en laboratorio se espera tener un CV menor a 10, en invernadero 20 o menos y en campo abierto 30 o menos.

Las pruebas de Tukey, corroboran los resultados obtenidos de las variables analizadas, donde la variable especies hay diferencia para la *Bacillus cereus* sin embargo existe similitud para *Bacillus thuringensis* y *Pseudomonas sp.* Para la variable Tratamiento, donde T3 tiene un efecto diferente sin embargo para los T0, T2, T4, T6 tienen el mismo efecto debido a que la concentración de pesticida es demasiado alta y T5 y T1 tienen efecto similar debido a que las especies eran diferentes pero la misma concentración de 800ppm.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Los suelos impactados por la aplicación continua de clorpirifos, contienen microorganismos capaces de degradarlo, tales como: *Bacillus cereus*, *Bacillus Thuringensis* y *Pseudomonas sp.*

Las pruebas de degradación de clorpirifos, muestran que la especie con mayor eficiencia fue *Bacillus cereus*, (la eficiencia se mide en términos de porcentaje) con un porcentaje promedio de 96.5%, para las especies *Bacillus Thuringensis* y *Pseudomonas sp.*, fueron 72.32% y 75.24% respectivamente. Mientras que para la concentración de 1600 ppm la eficiencia de *Bacillus cereus* fue de 45.7% y para *Bacillus Thuringensis* y *Pseudomonas sp.*, 33.18% y 45.33%.

La especie *Bacillus cereus* tiene una mejor eficiencia a concentraciones menores a 800 ppm, mientras que para concentraciones mayores el crecimiento se inhibe.

La tasa de degradación del pesticida en las cepas experimentales es cercana a las tasas encontradas en otros estudios, con un valor de 0.11 y 0.018, bajo 800 y 1600 ppm respectivamente.

La tasa de crecimiento microbiano es de 0.29 (*Bacillus cereus*), valor que refleja la eficiencia mostrada en el tratamiento del pesticida.

El menor tiempo de vida media de tratamiento se observa en la especie *Bacillus cereus* con 6.3 días y 37.5 días bajo 800 y 1600ppm respectivamente.

El incremento de la concentración del pesticida incide sobre la sobre la tasa de degradación, eficiencia y tiempo de vida media del pesticida, en todas las bacterias empleadas.

## 5.2 Recomendaciones

Repetir la experimentación, empleando como metodología de análisis cromatografía de gases para una evaluación precisa de la degradación del pesticida y evitar la ejecución de complicados cálculos de transformación de valores de biomasa celular a concentración de pesticida.

Ampliar la gama de variables que inciden sobre la degradación del pesticida en condiciones reales, tales como: humedad, temperatura, pH y conductividad.

Ejecutar las pruebas de degradación con las cepas experimentales empleadas en pruebas de microcosmos en suelo.



## REFERENCIAS

- Abad, Y. (2017). *Caracterización, identificación y evaluación de microorganismos auctoconos biorremediadores de suelo contaminado por agroquímicos en la provincia de Loja*. Recuperado el 27 de diciembre del 2018 de: <https://www.redalyc.org/pdf/573/5724403.pdf>
- Aceves. A, Estrada. K, Casta. L. (2015). *Use of Bacillus thuringiensis supernatant from a fermentation process to improve bioremediation of Chlorpyrifos in contaminated soils*.
- Akbar, S., & Sultan, S. (2016). *Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. Brazilian journal of microbiology*.
- Albert, L., y Loera, R., (2005). *Química y ecotoxicología de los insecticidas*, p. 177-190. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición*. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. De México, Instituto Nacional de Ecología.
- Antolínez N, Acero S, Martínez-Nieto P, Bernal-Castillo J. (2001). *Biodegradation of Malathion by marine bacteria isolated from the Colombian Cartagena-Bay. Regulación de la fertilidad en agroecosistemas de los Andes tropicales. Ponencia presentada en: IV Simposio Internacional Desarrollo Sustentable en los Andes. La estrategia para el siglo XXI; Mérida, Venezuela*. Recuperado el 27 de diciembre del 2018 de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-87062017000100009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062017000100009)
- Arregui M., Puricelli. E. (2008). *Mecanismos de Acción de Plaguicidas*. Dow Agosciencias Argentina S.A. Buenos Aires – República Argentina

- Arrieta, G., Hernández. A; Espinoza. A. M. (2004). *Diversity of Bacillusthuriensis Strains Isolated from Coffee Plantations Infested with the Coffee Berry Borer Hypothenemus hampei*.
- Awad, N.S., Sabit, H.H., Abo-Aba, S.E.M., Bayoumi, R.A. (2011). *Isolation, characterization and fingerprinting of some chlorpyrifos-degrading bacterial strains isolated from Egyptian pesticides-polluted soils*. *Afr. J. Microbiol.*
- Bansal, O. P. (2004). *Effects of various soil factors and amendments on the persistence and degradation of carbamate pesticides*. *Pollut.*
- Bansal, O. P. 2005. *Degradation studies of three carbamate pesticides in soils of Aligarh district as influenced by temperature, water content, concentration of pesticide, FYM and Nitrogen*. *Proc.Natl. Acad. Sci.*
- Bhatia S, Sharma D. (2010). *Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a new isolated strain pantoea agglomerans D23W3*.
- Bondarenko, S., Gan, J., Haver, D. L., and Kabashima, J. N. (2004). *Persistence of selected organophosphate and carbamate insecticides in waters from a coastal watershed*. *Environ. Toxicol.*
- Brenner, D., Krieg, N., & Staley, J. (s.f.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. USA: Springer.
- Bumpus, J.A., Kakkar, S.N., Coleman, R.D. (1993). *Fungal degradation of organophosphorus insecticides*. *J. Appl. Biochem. Biotechnol.*  
Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7686734>
- Calonge M., Pérez P.Y., Ordóñez C., Reguera R.M., Balaña F. R. y Ordóñez D. (2002). *Determinación de residuos de siete insecticidas organofosforados en frutas mediante cromatografía de gases con*

*detector de nitrógeno fósforo y confirmación por espectrometría de masas. Rev. Toxicol. 19, 55–60.*

Carvalho, F.P., (2006). *Agriculture, pesticides, food security and food safety*. Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: [https://www.academia.edu/23840850/Agriculture\\_pesticides\\_food\\_security\\_and\\_food\\_safety](https://www.academia.edu/23840850/Agriculture_pesticides_food_security_and_food_safety)

Castañeda. E, Sánchez L. (2016). *Evaluation of growth of four species of the genus Bacillus sp., the first step to understand their biocontrol effect on Fusarium sp.* Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702016000200006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702016000200006)

Cole, DC., Sherwood S., Crissman, C., Barrera, V. y Espinosa, P. (2002). *Pesticides and health in highland Ecuadorian potato production: Assessing impacts and developing responses. Int J Occup Environ Health. 8:182-190.* Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: [https://www.researchgate.net/publication/11099624\\_Pesticides\\_and\\_Health\\_in\\_Highland\\_Ecuadorian\\_Potato\\_Production\\_Assessing\\_Impacts\\_and\\_Developing\\_Responses](https://www.researchgate.net/publication/11099624_Pesticides_and_Health_in_Highland_Ecuadorian_Potato_Production_Assessing_Impacts_and_Developing_Responses)

DE Silva.J., Samarawickema. A., Wickermasinghe.R. (2006): *"Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure,* Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 100(9): 803-806, PMID: 16806335. Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806335>

Díaz, J., Guharay, F. y Miranda, F., (1999), *"Manejo de plagas", Manejo integrado de plagas en el cultivo de repollo.* Recuperado el 27 de diciembre del 2018 de: [https://www.researchgate.net/journal/1077-3525\\_International\\_journal\\_of\\_occupational\\_and\\_environmental\\_health](https://www.researchgate.net/journal/1077-3525_International_journal_of_occupational_and_environmental_health)

- Dogheim S.M, Gad Alla S.A., El–Marsafy A.M y Fahmy S.M (1999). *Monitoring pesticide residues in Egyptian fruits and vegetables in 1995*. Recuperado el 27 de diciembre del 2018 de: Recuperado el 27 de diciembre del 2018 de: [https://www.researchgate.net/publication/326681338\\_Monitoring\\_of\\_pesticide\\_residues\\_in\\_Egyptian\\_fruits\\_and\\_vegetables\\_during\\_1997](https://www.researchgate.net/publication/326681338_Monitoring_of_pesticide_residues_in_Egyptian_fruits_and_vegetables_during_1997)
- Eddleston. M., Street .M., Self. I., Thompson. A.; King. T.; Williams. N.; Naredo. G., Dissanyaje. K., YU, L.-M.; Worek. F.; John. H.; Smith. S.; Thiermann. H.; Harris .B., Clutton. R.: “A role for solvents in the toxicity of agricultural organophosphorus pesticides”. Recuperado el 11 de Diciembre de 2018, ISSN: 0300-483X, DOI: 10.1016/j.tox.2012.02.005.
- EPA. (2005) “Pesticidas”. *Fungicidas. USA,s.f.* Recuperado el 21 de Diciembre de 2018 de : <http://piensachile.com/2014/04/los-principales-pesticidas-son-mas-toxicos-para-las-celulas-humanas-que-el-conjunto-de-sus-principios-activos-reconocidos-2/>
- Fan, C. and Liao, M.-C. (2009). *The mechanistic and oxidative study of methomyl and parathion degradation by fenton process. World Acad. Sci. Eng. Technol. 59: 87–91.* Recuperado el 11 de Diciembre de 2018: [https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-7425-2\\_4](https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-7425-2_4)
- FAOSTAT. (2017). *Domain Pesticides Use 2010–2014. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.* Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>(accessed 17 October 2017).

- Fernández. G (s.f) *Intoxicación por plaguicidas, fisiopatología, clínica, tratamiento. Talleres gráficos de A. Monteverde & Cia. Montevideo*, Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/01-1979-04.htm>
- FLORES, P. (2010). *Efecto de la aplicación de dos herbicidas para el control de malezas en dos variedades de Colza (Brassica sp.), en la Provincia de Imbabura, Catón Ibarra, Granja Experimental E.C.A.A. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agropecuario. Escuela de ciencias Agrícolas y Ambientales, PUCE-SI. Ibarra, Ecuador. (En línea)*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de: <http://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/139/1/T72375.pdf>
- Francescángeli. N., Martí. H. y Stoppani. M. (2003). *“Evaluación de cultivares y fechas de siembra: Producción de Brócoli en Invernadero”*, *Revista de información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de: <https://studylib.es/doc/1240771/cd-4196.pdf>
- Fukuto R. (2007). *Relationships between the Structure of Organophosphorus Compounds and their Activity as Acetylcholinesterase Inhibitors*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1567830/Ghanem>,
- Gilani. S., Ageen. M., Shah. H., and Raza, S. (2010). *Chlorpyrifos degradation in soil and its effect on soil microorganisms. J.* Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Gilani,+S.+T.+S.,+Ageen,+M.,+Shah,+H.,+and+Raza,+S.+2010.+Chlorpyrifos+degradation+in+soil+and+its+effect+on+soil+microorganisms.+J.+Animal+Plant+Sci.+20:+99%E2%80%93102.&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwjwzPmG6cvgAhVEZKwKHXILCZ4QBQgoKAA&biw=1536&bih=750>.

- Gilman. A., Rall. T., Nies. A. and Taylor. P. (1990). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press, N.Y.
- Gouma, S. (2009). *Biodegradation of mixtures of pesticides by bacteria and white rot fungi*, Ph.D. Thesis, School of Health Cranfield University, 416. Recuperado el 22 de Diciembre de 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/?term=goodman%20and%20gilman%27s%3Athe%20pharmacological%20basis%20of%20therapeutics%5BTittle%5D>
- Grube. A., Donaldson. D., Kiely.T., Wu. L. (2011). *Pesticides industry sales and usage: 2006 and 2007 market estimates*. Biological and economic analysis division. Office of pesticide programs. Office of chemical safety and pollution prevention. U.S Environmental protection agency. Washington, DC 20460. Recuperado el 22 de Diciembre de 2018 de: <https://www.epa.gov/pesticides/pesticides-industry-sales-and-usage-estimates>.
- Gutiérrez, Pinzón, Londoño, Blanch, & Rojas, (2010). *Evaluación agronómica de cultivos de brócoli (Brassica oleracea var. italica)*.
- Hoostal. J., Bullerjahn. S., and Mckay. L. (2002). *Molecular assessment of the potential for in situ bioremediation of PCBs from aquatic sediments*. *Hydrobiologia*. Recuperado el 22 de Diciembre de 2018 de: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015519409533>
- HUNG. L., J. M. TRAPPE, (1983). *Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro*.
- INIAP. (2011). *Insecticidas de uso agrícola en el Ecuador*. Recuperado el 22 de Diciembre de 2018 de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1121>.
- J.L. Wang, S.p. Li, Z.Huang (2004). *Environmental Microbiology (second Edition)* Beijing: Higher Education Press. Recuperado el 22 de

Diciembre de 2018 de:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11461-007-0050-z>

Jakoby, W.B. (1980). *Enzymatic basis of detoxication. Vol. II, Academic Press, N.Y.* Recuperado el 22 de Diciembre de 2018 de:  
<https://www.elsevier.com/books/enzymatic-basis-of-detoxication-volume-1/jakoby/978-0-12-380001-5>

Jury W.A., Spencer W.F. y Farmer W.J. (1983). *Use of models for assessing relative volatility, mobility and persistence of pesticides and other trace organics in soil systems. En: Hazard Assessment of Chemicals: Current Developments. (J. Saxena Ed.)*. Recuperado el 23 de Diciembre de 2018 de: [https:// Use ofmodelsforassessing+relative+volatility,+mobility+and+persistence e+of+pesticides+and+other+trace+organics+in+soil+systems](https://Useofmodelsforassessing+relative+volatility,+mobility+and+persistence+of+pesticides+and+other+trace+organics+in+soil+systems).

Kegley S. y Wise L.J. (1998). *Pesticides in fruits and vegetables. University Science Books. Universidad de California, Berkeley*. Recuperado el 23 de Diciembre de 2018 de:  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992009000200005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000200005)

Klaassen. A., Amdur. M. and Foul. J. (1986) *Casarett and Doull's Toxicology (tje basic science of poison). Macmillan Publishing Co.* Recuperado el 23 de Diciembre de 2018 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog?term=Casarett%20and%20Doull%27s%20toxicology%5BTtitle%5D>

Klimmer. R. (1968). *Los Agroquímicos*. Recuperado el 23 de Diciembre de 2018 de: <https://www.scribd.com/document/368492138/Papa-Agroquimicos-Tesis>

Lagunes T.A. y Villanueva J.A. (1994). *Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas*. Recuperado el

23 de Diciembre de 2018 de:  
<https://www.redalyc.org/html/370/37012009005/>

Le Gall, J. (2009). *“El brócoli en Ecuador: la fiebre del oro verde. Cultivos no tradicionales, estrategias campesinas y globalización”*, Recuperado el 23 de Diciembre de 2018 de:  
<http://docplayer.es/73911199-El-brocoli-en-ecuador-la-fiebre-del-oro-verde.html>

Liu, Y., & Tzeng, Y. (1982). *Diamondback Moth resistance to several synthetic pyrethroids. Journal of Economic Entomology* 74:393-39. Recuperado el 5 de Noviembre del 2018 de:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010390162011000200004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010390162011000200004).

Lopera, Margarita María. *Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo Phanerochaete chrysosporium. Tesis para optar a título de magíster en Ingeniería Ambiental*. Recuperado el 27 de Noviembre del 2018 de:  
<https://www.redalyc.org/html/430/43003306/>

Madhuri, J., Rangaswamy, J. (2009). *Biodegradation of selected insecticides by Bacillus and Pseudomonas sp. in ground nut fields*. Recuperado el 25 de Noviembre del 2018 de:  
[https://www.researchgate.net/publication/283409281\\_Biodegradation\\_of\\_selected\\_insecticides\\_by\\_Bacillus\\_and\\_Pseudomonas\\_sp\\_s\\_in\\_groundnut\\_fields](https://www.researchgate.net/publication/283409281_Biodegradation_of_selected_insecticides_by_Bacillus_and_Pseudomonas_sp_s_in_groundnut_fields)

MADR. (2006). *“Estudio de caso: Brócoli ecuatoriano”*, Recuperado el 25 de Noviembre del 2018 de:  
[http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_agronet/200642717741\\_ESTUDIOD\\_ECASObrocoli.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200642717741_ESTUDIOD_ECASObrocoli.pdf)

Maduell, P., Armengol, A, Orduz S. (2010). *Can Soil Physicochemical Characteristics Affect the Presence of Bacillus thuringiensis*



Spores. Recuperado el 25 de Noviembre del 2018 de :  
<https://dspace.ups.edu.ec/handle/15876789/14786>

Maldonado, L. (2017). *EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE UN INSECTICIDA ORGANOFOSFORADO EN MUESTRAS DE SUELO DE CULTIVOS DE PAAPA MEDIANTE Trichoderma harzianum y Pleurotus ostreatus*. Recuperado el 25 de Noviembre del 2018 de: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13678>

Manahan, S.E. (1990). *Toxicological Chemistry (a guide to toxic substances in chemistry)*. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Mich. Recuperado el 29 de Noviembre del 2018 de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jat.2550090517>

Manual de Plaguicidas, Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (1999). *Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de Intoxicaciones agudas causadas por insecticidas*.

Muller. K., Magesan. N., Bolan, N. (2007). *A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil*. *Agricult. Ecosyst. Environ.* Recuperado el 29 de Noviembre del 2018: <https://www.tib.eu/en/search/id/BLSE%3ARN202911492/A-critical-review-of-the-influence-of-effluent/>

Nicolade, A., Quintana, D. (2010). *UTILIZACION DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO (Azotobacter) Y SOLUBILIZADORAS DE FOSFORA EN EL CULTIVO DE BROCOLI (Brassica oleraceae var. Legacy) EN OTAVALO*. Recuperado el 29 de Noviembre del 2018 de : <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/264>

Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS). (1993), *División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS*. Recuperado el 29 de Diciembre del 2018 de:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/170244/salud-americas-1993-1996-vol2.pdf?sequence=2>

- Otero G., Porcayo R., Aguirre D.M. y Pedraza M. (2000). *Estudio neuroconductual en sujetos laboralmente expuestos a plaguicidas. Rev. Int. Contam. Ambient.* Recuperado el 29 de Diciembre del 2018 de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992009000200005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000200005)
- Pérez. M. (2009) “Residuos de Plaguicidas Organofosforados en Cabezuela de Brócoli, (*Brassica oleracea*) Determinados por Cromatografía de Gases”. Recuperado el 5 de Noviembre del 2018 de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v25n2/v25n2a5.pdf>
- Parekh N., Suett L., Roberts. J., McKeon. T., Shaw.D. Jukes .A. (1994). *Carbofuran degrading bacteria from previously treated field soils. J. Appl. Bacteriol.*
- Pedroso de Moraes, C., & Amilton, L. (2012). *Toxicity and residual control of Plutella xylostella L. (Lepidoptera: Plutellidae) with Bacillus thuringiensis Berliner and insecticides. Cienc. Rural, 42(8).* Recuperado el 16 de noviembre del 2018 de: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010384782012000800001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782012000800001)
- Pinzón, H., Isshiki, M. (2001). “El cultivo de algunas hortalizas promisorias en Colombia”, 1era. Edición, Editorial Produmedios, Bogotá, Colombia. Recuperado el 16 de noviembre del 2018 de: <https://studylib.es/doc/1240771/cd-4196.pdf>

Pitarch A.E., López F.J., Serrano R. y Hernández F. (2001). *Multiresidue determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in human biological fluids by capillary gas chromatography*. Recuperado el 16 de noviembre del 2018 de: <https://pdfs.semanticscholar.org/.../62793436fbbbd6cfbdb61c054..>

Proexant. (1992). *“Productos de exportación: Manual del brócoli”*, 1era. Edición, Editorial Naranja, Quito, Ecuador. Recuperado el 16 de Noviembre del 2018 de: <https://bitstream/15000/4599/1/CD-4196.pdf>

Racke. KD, Steele. KP, Yoder. RN, Dick. W., Avidov. E. (1996). *Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil*. Recuperado el 16 de November del 2018 de: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9506141>

ROMANYK. N., CADAHÍA. D. (2002). *Plagas de insectos en las masas forestales*. Mundi- Prensa, Madrid. Recuperado el 16 de Noviembre del 2018 de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000078&pid=S0120-0488200900020000900026&lng](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000078&pid=S0120-0488200900020000900026&lng)

Santillana, N.(2006). *Producción de biofertilizantes utilizando Pseudomonas sp.* Recuperado el 2 de Diciembre del 2018 de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S17262162006000100012&script=sci\\_arttext&tlng=en#tab01](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S17262162006000100012&script=sci_arttext&tlng=en#tab01)

Sherwood, S., Cole, DC. and Murray, D. 2007. *It's time to ban highly hazardous pesticides: An international call for LEISA readers*. LEISA. Recuperado el 2 de Diciembre del 2018 de: [https://www.researchgate.net/...International...Highly\\_Hazardous\\_](https://www.researchgate.net/...International...Highly_Hazardous_)

Shetty. PK, Murugan. M, Sreeja KG. (2008) *Crop protection stewardship in India: wanted or unwanted*. Recuperado el 2 de Diciembre del 2018 de:

[https://www.jstor.org/stable/24102595?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/24102595?seq=1#page_scan_tab_contents)

Shibamoto, T. Y Bjeldanes, L. (1996). *Introducción a la toxicología de los alimentos*. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza. Recuperado el 2 de Diciembre del 2018 de: [http://.ugr.es/~legaltoxicoaf/ficheros/.../pdf/GUIA\\_TOXIALIM\\_CTA\\_2014\\_2015.pdf](http://.ugr.es/~legaltoxicoaf/ficheros/.../pdf/GUIA_TOXIALIM_CTA_2014_2015.pdf)

Singh. P., Khattar. S., Nadda. J., Singh. Y., Garg. A., Kaur. N., Gulati. A., (2011). *Chlorpyrifos degradation by the Cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PUPCCC 64*. *Environ*. Recuperado el 2 de Diciembre del 2018 de: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0472-x>.

Singh. P, Sharma.S, Saini.H, Chadha.B (2009). *Biosurfactant production by Pseudomonas sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of Chlorpyrifos*. Recuperado el 22 de December del 2018 de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2009.02672.x>

Solagro. (2009). *Información completa del brócoli*. Recuperado el 15 de Diciembre del 2018. de: <http://www.solagro.com.ec/cultdet.php?vcultivo=Br%F3coli>

Stella. V., Borchardt. R., Hageman. M., Oliyai. R., Maag. H., & Tilley. J. (2007). *Prodrugs: Challenges and rewards* Recuperado el 15 de Diciembre del 2018 de: <https://www.springer.com/la/book/9780387497822>

Stella. V., Borchardt. R., Hageman. M., Oliyai. R., Maag. H., Tilley. J. Surekha. R.M., Lakshmi. P.K.L., Suvarnalatha. D., Jaya. M., Aruna. S., Jyothi. K., Narasimha. G., Venkateswarlu. K., (2008). *Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacterium from agricultural soil and its growth response*. *Afr. J. Microbiol.*

- Swati. A., Singh, D. K. (2002). *Utilization of chlorpyrifos by Aspergillus Niger and A. flavus as carbon and phosphorus source. 17th World* Recuperado el 15 de Diciembre del 2018 de: <https://scialert.net/fulltext/?doi=jm.2008.293.307>
- Tilman. D, Cassman. K.G, Matson. P.A, Naylor. R, Polasky. S (2002). *Agricultural sustainability and intensive production practices.* Recuperado el 15 de Diciembre del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167873>
- Torres C. (2002). *Manual agropecuario tecnologías orgánicas de la granja autosuficiente.* Recuperado el 15 de Diciembre del 2018 de: <http://agris.fao.org/agrisearch/search.do?recordID=DO2003101076>
- Trujillo, C. (2008). *Estimación de las pérdidas agrícolas en condiciones de riesgo.* Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <http://www.gestiopolis.com/estimacion-de-las-perdidas-agricolas-encondiciones-de-riesgo/>
- US EPA. (2006). *Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.* Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/chlorpyrifos\\_fs.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/chlorpyrifos_fs.htm).
- Valencia. R., Sánchez. A.J., Gómez. O.J..., Juárez. S.L., García. G.E., Montiel G.J., García N.E. y Waliszewski S.M. (2005). *Vydate L-24, un plaguicida carbámico que induce aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de Vicia faba. Rev.* Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992009000200005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000200005)
- Waliszewski S.M., Bermúdez M.T., Silva C.S., Infanzón R.M., Carvajal O., Gómez A.S., Villalobos P.R., Saldaña V., Melo G., Esquivel S.,

- Castro F., Ocampo H., Torres J. y Hayward Jones P.M. (2005). *DDT's, HCH and HCB levels in breast adipose tissue in women with breast tumors*. Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/215>
- Washburn. A. D. (2003). *The Environmental Fate of Methdathion*. Sacramento Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring Branch. Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <https://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/.../fatememo/methidathion.pd>.
- Wu S, Peng Y, Huang Z, Huang Z, Xu L, Ivan G, Guan X, Zhang L, Zou S. J. (2015). *Basic Microbiol*. Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24243520>
- Xu.G.M., Li. Y.Y., Zheng. W., Peng. X., Li. W., Yan. Y.C. (2007). *Mineralization of Chlorpyrifos by co-culture of Serratia and Trichosporon sp. Biotechnol. Lett*. Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609859>
- Yates. S.R., McConnell. L.L., Hapeman. C.J., Papiernik. S.K., Gao. S., Trabue, S.L. (2011). *Managing agricultural emissions to the atmosphere: State of the science, fate and mitigation and identifying research gaps, J. Environ*. Recuperado el 27 de Diciembre del 2018 de: <https://www.ars.usda.gov/arsuserfiles/20360500/pdf.../P2360.pdf>
- Z. Y. Liu et al. (2012). "Bacterial Degradation of Chlorpyrifos by *Bacillus cereus*", *Advanced Materials Research*. Recuperado el 30 de Diciembre del 2018 de: <https://www.scientific.net/AMR.356-360.676>
- ZAK. B.(1973). *Classification of Ectomycorrhizae*. In: G. C. Marks y T. T. Kozlowski (eds.) *Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology*. Academic. Recuperado el 30 de Diciembre del 2018 de: [https://www.jstor.org/stable/8610?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/8610?seq=1#page_scan_tab_contents)

ZHANG, W.; ASIRI, A.M.; LIU, D.; DU, D.; LIN, Y.: (2014). *Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents*”, TrAC Trends in Analytical Chemistry. Recuperado el 30 de Diciembre del 2018 de: DOI: 10.1016/j.trac.2013.10.007.

Zhao. XH, Wang. J. (2012). *A brief study on the degradation kinetics of seven organophosphorus pesticides in skimmed milk cultured with Lactobacillus spp. at 42 °C*. Recuperado el 30 de Diciembre del 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755964/>

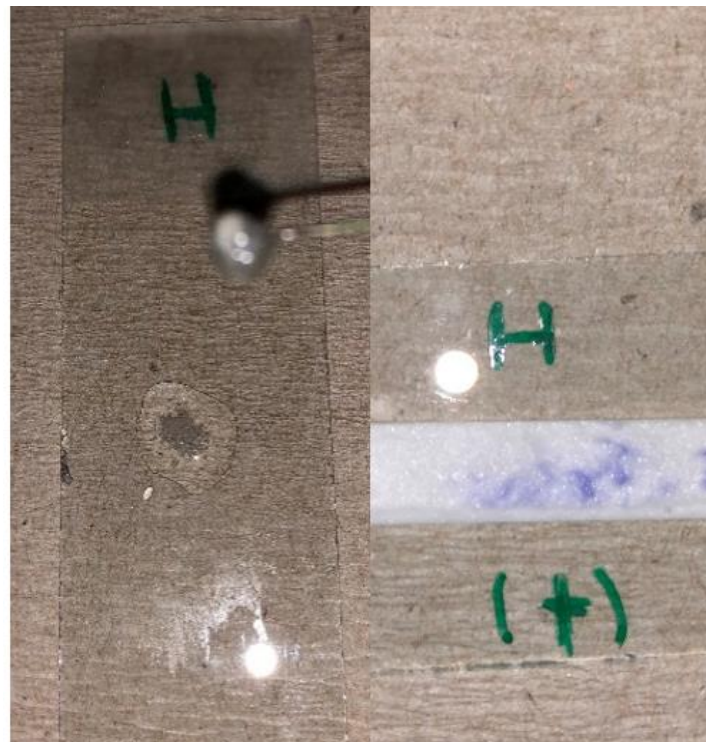
## **ANEXOS**



**Anexo 1.** Conteo Microbiano de la cepa F



**Anexo 2.** Pruebas de oxidasa y catalasa de la cepa H.



**Anexo 4. Cálculo de los gramos de bacteria con dilución 1:1090**

<b><i>Pseudomonas sp.</i></b>				<b><i>Bacillus Cereus</i></b>				<b><i>Bacillus thuringiensis</i></b>			
<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>1Re</sub> p</b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>2Re</sub> p</b>	<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>1Re</sub> p</b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>2Re</sub> p</b>	<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>1Re</sub> p</b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>2Re</sub> p</b>
0.16	0.17	0.15	0.14	0.20	0.20	0.18	0.19	0.17	0.20	0.15	0.15
95	46	87	47	16	97	02	51	69	71	37	18
0.56	0.66	0.66	0.48	0.82	0.64	0.79	0.87	0.53	0.58	0.36	0.51
17	27	34	43	45	82	99	99	98	21	57	45
0.83	0.86	0.80	0.62	1.10	1.03	1.10	1.05	0.92	0.92	0.68	0.73
85	09	41	42	28	26	15	98	51	35	40	71
0.89	0.89	0.85	0.73	1.19	1.19	1.12	1.14	1.00	1.02	0.90	0.83
51	15	10	95	89	99	09	23	74	00	61	22
0.90	0.90	0.86	0.79	1.21	1.21	1.19	1.20	1.01	1.03	0.96	0.89
18	88	69	08	99	06	50	64	78	47	27	33
0.90	0.89	0.86	0.83	1.21	1.24	1.18	1.16	1.01	1.00	0.92	0.98
49	99	16	06	54	84	50	62	53	91	76	29
0.90	0.88	0.89	0.84	1.19	1.17	1.14	1.18	1.04	1.02	0.94	0.95
52	50	75	45	34	85	94	05	86	62	37	08
0.90	0.92	0.88	0.86	1.16	1.16	1.19	1.24	0.97	0.97	0.95	0.95
46	02	50	48	88	04	79	91	72	20	08	95
0.90	0.89	0.88	0.85	1.20	1.21	1.17	1.18	0.99	0.97	0.94	0.96
34	87	33	18	80	48	46	89	54	28	56	33
0.89	0.89	0.91	0.90	1.20	1.21	1.19	1.20	1.01	0.97	1.00	0.98
02	25	70	06	80	48	60	57	59	20	06	97
0.91	0.92	0.83	0.84	1.21	1.22	1.16	1.15	0.95	0.95	0.98	0.88
03	21	78	89	87	71	11	62	01	59	86	43

### Anexo 5. Cálculo de los gramos de carbono de la bacteria

<i>Pseudomonas sp.</i>				<i>Bacillus Cereus</i>				<i>Bacillus thuringiensis</i>			
C <sub>1Re</sub>		C <sub>2Re</sub>		C <sub>1R</sub>		C <sub>2Re</sub>		C <sub>1Re</sub>		C <sub>2Re</sub>	
C <sub>1</sub>	p	C <sub>2</sub>	p	C <sub>1</sub>	ep	C <sub>2</sub>	p	C <sub>1</sub>	p	C <sub>2</sub>	p
0.10	0.11	0.10	0.09	0.1	0.13	0.1	0.12	0.11	0.13	0.09	0.09
71	03	02	14	27	2	14	32	17	08	71	59
0.35	0.41	0.41	0.30	0.5	0.40	0.5	0.55	0.34	0.36	0.23	0.32
48	86	90	59	21	9	05	57	09	76	10	49
0.52	0.54	0.50	0.39	0.6	0.65	0.6	0.66	0.58	0.58	0.43	0.46
96	37	78	42	97	2	96	93	43	33	20	55
0.56	0.56	0.53	0.46	0.7	0.75	0.7	0.72	0.63	0.64	0.57	0.52
53	30	75	71	57	8	08	14	63	42	23	56
0.56	0.57	0.54	0.49	0.7	0.76	0.7	0.76	0.64	0.65	0.60	0.56
96	40	75	95	70	5	55	19	28	35	80	42
0.57	0.56	0.54	0.52	0.7	0.78	0.7	0.73	0.64	0.63	0.58	0.62
15	84	42	46	68	8	48	66	13	73	58	08
0.57	0.55	0.56	0.53	0.7	0.74	0.7	0.74	0.66	0.64	0.59	0.60
17	89	69	34	54	4	26	56	23	81	60	05

0.57	0.58	0.55	0.54	0.7	0.73	0.7	0.78	0.61	0.61	0.60	0.60
13	11	89	62	38	3	57	89	72	39	05	60

0.57	0.56	0.55	0.53	0.7	0.76	0.7	0.75	0.62	0.61	0.59	0.60
06	76	79	80	63	7	42	09	87	44	72	84

0.56	0.56	0.57	0.56	0.7	0.76	0.7	0.76	0.64	0.61	0.63	0.62
22	37	92	88	63	7	55	15	16	39	20	51

0.57	0.58	0.52	0.53	0.7	0.77	0.7	0.73	0.60	0.60	0.62	0.55
49	24	91	61	70	5	33	02	01	37	44	85

---

## ANEXO 6. Resultados de la identificación Bacteriana Cepa H



Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador



**DISerLAB**  
**PUCE**

Diagnóstico, Investigación  
Servicios, Laboratorios

Av. 12 de Octubre y Patria  
E-MAIL: [diserlab@puce.edu.ec](mailto:diserlab@puce.edu.ec)  
RUC: 1790105601001  
Telef: 2991727  
Fax: 2991726  
Quito - Ecuador

### RESULTADOS DE LA MUESTRA N°: MAg-68-2018

#### 1.- IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: H

Taxonomía	H
<b>Dominio:</b>	Bacteria
<b>Filo:</b>	Firmicutes
<b>Clase:</b>	Bacilli
<b>Orden:</b>	Bacillales
<b>Familia:</b>	Bacillaceae
<b>Género:</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Especie:</b>	<i>cereus</i>

No.	Pruebas bioquímicas	H
1	Coloración Gram	Gram positivos
2	Agar Sangre	C
3	Agar Mac Conkey	NC
4	Hemólisis	Beta-hemolítico
5	Catalasa	+
6	Oxidasa	-
7	Motilidad	+
8	Simons citrato	+
9	Ureasa	-
10	Fermentación de la Glucosa	+
11	Fermentación de la Lactosa	-
12	D-Xilosa	-
13	D-Mannitol	-
14	Indol	-
15	Lisina descarboxilasa	-
16	Oinitina descarboxilasa	-
17	Producción de H <sub>2</sub> S	-
18	Producción de gas	-
19	Voges proskauer	+
20	Reducción del Nitrato	+
21	Crecimiento en NaCl al 7%	C
22	Hidrólisis del almidón	+
23	Hidrólisis de la caseína	+
24	Hidrólisis de la gelatina	+
	<b>Resultado</b>	<b>H</b>
	<b>Género y especie</b>	<i>Bacillus cereus</i>
	<b>Metodología</b>	Pruebas bioquímicas

C : Crecimiento; NC: No hay crecimiento

## Anexo 7. Resultados de la identificación Bacteriana Cepa I



Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador



**DISerLAB**  
**PUCE**

Diagnóstico, Investigación  
Servicios, Laboratorios

Av. 12 de Octubre y Patria  
E-MAIL: [diserlab@puce.edu.ec](mailto:diserlab@puce.edu.ec)  
RUC: 1790105601001  
Telef: 2991727  
Fax: 2991726  
Quito - Ecuador

### 2.- IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: I

Taxonomía	I
<b>Dominio:</b>	Bacteria
<b>Filo:</b>	Firmicutes
<b>Clase:</b>	Bacilli
<b>Orden:</b>	Bacillales
<b>Familia:</b>	Bacillaceae
<b>Género:</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Especie:</b>	<i>thuringensis</i>

No.	Pruebas bioquímicas	I
1	Coloración Gram	Gram positivos
2	Agar Sangre	C
3	Agar Mac Conkey	NC
4	Hemólisis	Beta-hemolítico
5	Catalasa	+
6	Oxidasa	-
7	Motilidad	-
8	Simons citrato	-
9	Ureasa	-
10	Fermentación de la Glucosa	+
11	Fermentación de la Lactosa	-
12	D-Xilosa	-
13	D-Mannitol	-
14	Indol	-
15	Lisina descarboxilasa	-
16	Oinitina descarboxilasa	-
17	Hidrólisis de la gelatina	+
18	Hidrólisis de la caseína	+
19	Crecimiento en NaCl al 5%	+
	<b>Resultado</b>	<b>I</b>
	<b>Género y especie</b>	<i>Bacillus thuringensis</i>
	<b>Metodología</b>	Pruebas bioquímicas

C: Crecimiento; NC: No hay crecimiento

### 3.- IDENTIFICACIÓN: F (Se aislan dos bacterias):

*Bacillus cereus* (F1)

*Pseudomonas spp.* (F2)

Resultado	F1
<b>Género y especie</b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b>Metodología</b>	Pruebas bioquímicas



## Anexos 8. Resultados de la identificación Bacteriana Cepa F

Taxonomía	F2
<b>Dominio:</b>	Bacteria
<b>Filo:</b>	Proteobacteria
<b>Clase:</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden:</b>	Pseudomonadales
<b>Familia:</b>	Pseudomonasaceae
<b>Género:</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Especie:</b>	<i>especies</i>

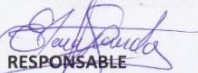
No.	Pruebas bioquímicas	F2
1	Coloración Gram	Gram negativos
2	Agar Sangre	C
3	Agar Mac Conkey	C
4	Agar King B	C
5	Catalasa	+
5	Oxidasa	-
6	Motilidad	+
7	Simons citrato	+
8	Ureasa	-
9	Fermentación de la Glucosa	-
10	Fermentación de la Lactosa	-
13	Indol	-
16	Producción de H <sub>2</sub> S	-
17	Producción de gas	-
	<b>Resultado</b>	<b>F2</b>
	<b>Género y especie</b>	<i>Pseudomonas spp.</i>
	<b>Metodología</b>	Pruebas bioquímicas

C: Crecimiento

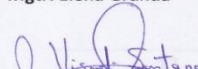
Resultado válido solo para las muestras analizadas

### INFORMACIÓN:

Las muestras analizadas N° MAg-68-2018 llegan en caja petri con medio de cultivo.

  
RESPONSABLE

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA  
Mgtr. Elena Granda

  
ANALISTA DE LABORATORIO

Lcda. Vismeli Santana

SELLO DEL LABORATORIO



## Anexo 9. Permiso de Investigación.

MINISTERIO DEL AMBIENTE



Oficio Nro. MAE-DNB-2018-0803-O

Quito, D.M., 27 de agosto de 2018

**Asunto:** SOLICITUD DE CERTIFICADO

Señorita  
Valerie Arabel Valdiviezo Vilema  
En su Despacho

De mi consideración:

En respuesta a lo solicitado por la estudiante de la Universidad de las Américas, Valerie Arabel Valdiviezo Vilema, me permito indicar que en base a la metodología presentada, en su plan de tesis a esta cartera estado se determina que para realizar su estudio no necesita acceder a un permiso de Investigación en base a la normativa ambiental vigente.

ART. 6.- Toda investigación científica relativa a la flora y fauna silvestre a realizarse en el Patrimonio Nacional de Áreas Naturales por personas naturales o jurídicas, nacionales o extranjeras, requiere de la autorización emitida por el Distrito Regional correspondiente.

Fuera del Patrimonio Nacional de Áreas Naturales, no se requiere autorización de investigación, salvo que el proyecto respectivo implique la recolección de especímenes o muestras.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

*Documento firmado electrónicamente*

Sr. Santiago Daniel Silva Lachard  
**DIRECTOR NACIONAL DE BIODIVERSIDAD**

Referencias:  
- MAE-SG-2018-9726-E

Anexos:  
- 97260646400001533324272.pdf

**Dirección:** Calle Madrid 1159 y Andalucía • Código Postal: 170525 / Quito • Ecuador . Teléfono: 593-2 398-7600



