



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE HUMATO 7+ EN LA DEGRADACIÓN
MICROBIANA DE PESTICIDAS.

AUTOR

Juan Sebastián Espinel Barthelotti.

AÑO
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE HUMATO 7+ EN LA DEGRADACIÓN
MICROBIANA DE PESTICIDAS

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

Profesor Guía
MsC. Miguel Ángel Gualoto Oñate.

Autor
Juan Sebastián Espinel Barthelotti.

Año
2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de la Influencia de Humato 7+ en la degradación microbiana de pesticidas, a través de reuniones periódicas con el estudiante Juan Sebastián Espinel Barthelotti, 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 influencia de humato 7+ en la degradación microbiana de pesticidas, del estudiante Juan Sebastián Espinel Barthelotti, 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 DE AUTORÍA 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”.

Juan Sebastián Espinel Barthelotti
C.I. 0503434664

AGRADECIMIENTO

Agradezco al director de carrera, el Ing. Alejandro Gonzales, quien me colaboro con los medios necesarios para el desarrollo del trabajo investigativo, a la Magister Indira Fernandina Black Solís y al master Miguel Gualoto por la apertura, colaboración, y su guía en la ejecución de la presente investigación. Finalmente a los maestros de la carrera que con sus enseñanzas me permitieron facilitar la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Primero quiero agradecer a Dios por la vida, a mis padres Bayardo Espinel y Natasha Barthelotti quienes han hecho posible que logre uno de mis principales objetivos que es desarrollarme como profesional, también a mi hermano Andrés Espinel y a mi novia Gabriela Ribadeneira por estar a mi lado apoyándome a lo largo de toda la carrera.

RESUMEN

El sector florícola en el Ecuador ha incrementado su participación en el mercado internacional, las exportaciones de los 10 últimos años evidencian el crecimiento, ya que, en el primer trimestre del 2008 se exportaron 27.895 t aumentando a 46.352 t en el primer trimestre del 2018 (Expoflores, 2018), lo que ha generado beneficios económicos a los productores y plazas laborales; sin embargo, el aumento de la producción ha ocasionado un desgaste considerable del suelo, debido a la aplicación masiva de pesticidas. El principal problema, es la acumulación de sus residuos que impiden, el transcurso normal de los procesos bioquímicos edáficos, por la reducción sustancial de los microorganismos benéficos. La consecuencia de esto, es la reducción paulatina en la productividad, que más temprano que tarde motivará el cierre de muchas plantaciones.

Bajo estas circunstancias se hace necesario diseñar e implementar metodologías de descontaminación de suelos que impidan la acumulación de pesticidas en los mismos, y su deterioro definitivo. Una de las metodologías adecuadas para resolver este problema, es la biorremediación, que emplea microorganismos edáficos autóctonos para la mineralización completa de pesticidas, sin la producción de metabolitos secundarios de elevada toxicidad y productos residuales que requieren tratamientos adicionales, que como es evidente, generan ingentes erogaciones económicas.

En el presente proyecto, se tomaron muestras de suelo contaminados de una florícola localizada en la parroquia de Tanicuchi, provincia de Cotopaxi, con el fin de aislar microorganismos edáficos tolerantes y con capacidad para degradar pesticidas organofosforados. El estudio se llevó a cabo a escala laboratorio, donde se analizaron los parámetros cinéticos del proceso de degradación y de los humatos de Na y K, sobre la tasa de degradación de los pesticidas experimentales. La capacidad de los microorganismos aislados para degradar pesticidas (*Bacillus thuringensis* y *Bacillus megatherium*), fue evaluada mediante pruebas de turbidez, de todas las especies positivas, fueron seleccionadas las que presentaron mayores valores de turbidez y se emplearon

en pruebas de degradación del pesticida organofosforado diazol, cultivadas en medio mineral, Difco Bushnel, a 30 °C, empleando como única fuente de carbono, al pesticida. La concentración de diazol empleada, fue de 600 ppm, en tanto que los humatos fueron empleados en dos concentraciones, de 0,01 y 05%. El transcurso de la degradación, fue evaluada por medición de la absorbancia de la solución experimental, durante 30 días cada 3 días.

Los resultados, permitirán diseñar una propuesta de remediación de suelos afectados por este tipo de pesticidas para el sector florícola y proteger el recurso suelo.

ABSTRACT

The flower sector in Ecuador has increased its participation in the international market, the exports of the last 10 years show the growth, since, in the first quarter of 2008, 27,895 t were exported, increasing to 46,352 t in the first quarter of 2018, what has generated economic benefits for producers and job places; however, the increase in production has caused considerable soil wear, due to the massive application of pesticides. The main problem is the accumulation of its residues that impede the normal course of edaphic biochemical processes, by the substantial reduction of beneficial microorganisms. The consequence of this is the gradual reduction in productivity, which sooner or later will lead to the closure of many plantations.

Under these circumstances it is necessary to design and implement soil decontamination methodologies that prevent the accumulation of pesticides in them, and their definitive deterioration. One of the adequate methodologies to solve this problem is bioremediation, which uses autochthonous soil microorganisms for the complete mineralization of pesticides, without the production of high toxicity secondary metabolites and residual products that require additional treatments, which, as is evident, generate enormous economic expenditures.

In this project, contaminated soil samples were taken from a flower shop located in the parish of Tanicuchi, province of Cotopaxi, in order to isolate tolerable soil microorganisms with the capacity to degrade organophosphorus pesticides. The study was carried out at the laboratory scale, where the kinetic parameters of the degradation process and of the Na and K humates were analyzed, on the degradation rate of the experimental pesticides. The ability of isolated microorganisms to degrade pesticides (*Bacillus thuringensis* and *Bacillus megatherium*), was evaluated by turbidity tests, of all the positive strains, those with the highest turbidity values were selected and used in degradation tests of the organophosphorus pesticide diazol, cultivated in mineral medium, Difco Bushnel, at 30 °C, using the only source of carbon, the pesticide. The concentration of diazol used was 600 ppm, while the humates

were used in two concentrations, 0.01 and 05%. The course of the degradation was evaluated by measuring the absorbance of the experimental solution, for 30 days every 3 days.

The results will make it possible to design a proposal for the remediation of soils affected by this type of pesticides for the floriculture sector and to protect the soil resource.

ÍNDICE

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Hipotesis	4
1.3.1. Hipótesis nula:	4
1.3.2. Hipótesis alternativa:	4
1.4. Objetivos	4
1.4.1. Objetivo General:.....	4
1.4.2. Objetivos Específicos:	5
1.5. Justificación de la Investigación	5
2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Plaguicida	6
2.1.1. Clasificación de los Plaguicidas	6
2.1.1.1. Por su toxicidad	7
2.1.1.2. Por su vida media.....	7
2.1.1.3. Por su estructura química.....	8
2.2. Pesticidas Organofosforados	9
2.2.1. Estructura Química Organofosforados.....	10
2.2.2. Modo de acción de los Organofosforados	11
2.2.3. Daños a la salud por Organofosforados	11
2.2.4. Propiedades de los Plaguicidas Organofosforados	11
2.2.4.1. Liposolubles	11
2.2.4.2. Mediana tensión de vapor	11

2.2.4.3. Degradables.....	11
2.2.5. Gama de Plaguicidas Organofosforados	12
2.3. Diazol, Pesticida utilizado para el estudio.....	14
2.3.1. Modo y Mecanismos de Acción	16
2.3.2. Manejo de Resistencia.....	16
2.3.3. Características y Generalidades	17
2.3.4. Compatibilidad.....	17
2.3.5. Biorremediación del diazinón (Diazol)	17
2.4. Rutas Metabólicas de degradación de los organofosforados	18
2.5. Humatos.....	18
2.5.1. Humatos y el agua	20
2.5.2. Humato y suelo	21
2.5.3. Procesos en los cuales participan los Humatos.....	22
2.5.4. Acción Protectora de Los Humatos	23
2.5.5. Humatos y metales pesados	23
3. CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	23
3.1. Toma de muestras de suelos.....	25
3.2. Siembra y aislamiento de especies bacterianas	25
3.3. Identificación de los microorganismos	25
3.4. Determinación de la eficiencia de las especies aisladas mediante ensayos de turbidez.	26
3.4.1. Selección de las especies experimentales	26
3.5. Identificación bioquímica de las especies	27
3.6. Ensayos de degradación de Diazol 600 EC	28

3.6.1. Variables Independientes.	28
3.6.2. Variables Dependientes.....	28
3.6.2.1. Medición de la absorbancia de las unidades experimentales... ..	29
3.6.2.2. Conteo bacteriano	29
3.6.6.3. Tratamientos.....	29
3.7. Determinación de parámetros cinéticos del proceso de degradación de Diazol 600 EC.....	29
3.8. Análisis de resultados	32
4. CAPITULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
4.1. Aislamiento de especies microbianas	33
4.2. Ensayos de turbidez	34
4.3. Identificación bioquímica de las especies	37
4.4. Ensayos de degradación de Diazol utilizando las especies seleccionadas.....	38
4.4.1. Pruebas de degradación del pesticida con <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
4.4.2. Tasa de crecimiento microbiano	44
4.4.3. Tasa de degradación de diazol.....	46
4.4.4. Tiempo de vida media.....	51
4.4.5. Eficiencia de la especie para degradar el pesticida	53
4.5. Análisis estadístico	54
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
5.1. Conclusiones	57
5.2. Recomendaciones	57

Referencias	59
ANEXOS	67

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El suelo es un componente vital en la Tierra, pero el uso que le da el ser humano lo está llevando a límites críticos. La pérdida de suelos productivos aumentará los precios de los alimentos y reducirá el acceso a ellos a muchas personas. La adecuada gestión del suelo, puede aumentar el abastecimiento de alimentos, reducir la inseguridad alimentaria de la población mundial, brindar una valiosa herramienta para la regulación del clima y un camino para salvaguardar los servicios de los ecosistemas (FAO, 2105).

Entre las amenazas que ponen en peligro las funciones del suelo están la erosión, la pérdida del carbono orgánico (COS), y el desequilibrio de nutrientes. Este panorama empeorará cada vez más, salvo que la sociedad, en conjunto con el sector privado, gobiernos y organizaciones internacionales definan acciones concertadas y acertadas hacia la gestión sostenible del mismo (FAO, 2105).

En Ecuador, debido a sus actividades agrícolas, se produce degradación del suelo por erosión. Sin embargo, según (Santos Saavedra & Castro Romero, 2012) se han realizado propuestas importantes, por ejemplo, se han desarrollado mapas de tasas de degradación mediante la aplicación de herramientas cartográficas que ofrecen las instituciones gubernamentales, la finalidad de esta iniciativa es mostrar las tasas de degradación por erosión de las zonas de mayor actividad agrícola del país, con su ayuda se pueden generar programas de remediación y recuperación de las propiedades del suelo en zonas notablemente afectadas.

Nuestro país cuenta con suelos volcánicos con gran potencial agrícola y una amplia gama de climas en distancias cortas. Lastimosamente con el paso del tiempo y debido al alto uso de agro-químicos los suelos productivos están perdiendo sus propiedades y su productividad causando efectos negativos a la

seguridad alimentaria y economía de la población ecuatoriana (Noni & Trujillo, 2005).

En la actualidad el sector florícola ha experimentado un crecimiento notable dentro del sector agrícola nacional, lo que a su vez involucra un alto que uso de pesticidas. Por la naturaleza de su producción, las florícolas fertilizan y realizan control de plagas de forma semanal, siendo los pesticidas órgano fosforados los de mayor uso. Si bien, estos pesticidas ayudan a controlar efectivamente a las plagas; también ocasionan problemas de contaminación ambiental. Siendo el agua el componente más afectado, ya que, que los pesticidas son solubles en ella (Hidalgo J. , 2017)

En ese sentido el crecimiento del sector florícola involucra también al uso intensivo de plaguicidas. A pesar, de que la venta de muchos plaguicidas ha sido restringida en el país, existen personas que los traen de contrabando que de países en donde es legal su uso, y es ahí cuando el agricultor al ver su necesidad lo va a seguir utilizando sin pensar en los daños que puede ocasionar en la población (Acción Ecológica, 2000).

En el año 2016 Ecuador prohibió la importación de Aldrín, Dieldrin, Endrin, BHC, Canfeclor (Toxaphene), Clordimeform (Galecron y Fundal año), Clordano, DDT, DBCP, Lindano, EDB, , Amitrole, compuestos arsenicales, compuestos mercuriales y de plomo, tetracloruro de carbono, leptaños, Heptacloro, clorobenzilato, Methyl, Diethyl y Ethyl Paration, Mirex y Dinoseb. De los doce plaguicidas de la “docena sucia” letalmente tóxicos y peligrosos varios de estos productos son ilegalmente importados al Ecuador a excepción del Dibromo Etileno (EDB) (López G. , 2016).

1.2. Planteamiento del problema

El problema identificado, es la falta de metodologías eficientes sustentables económicamente y ambientalmente, de descontaminación de suelos afectados por pesticidas en el sector florícola nacional. La actividad primaria para la implantación del cultivo de flores, es su desinfección, por medias sustancias

que actúan contra diversas bacterias, como el Bromuro de Metilo, que elimina a la biodiversidad edáfica, quitándole la capacidad de autodepuración natural, que se sustenta en sus microorganismos benéficos. Seguidamente las tareas de laboreo y programas de fertilización masiva y de control de plagas generan cambios indeseables en las propiedades de los suelos, se altera el pH, capacidad de campo, estructura, granulometría intercambio iónico y producen su salinificación, con la consecuente pérdida de fertilidad.

Los contaminantes no se restringen al suelo, también por procesos de volatilización afectan a la calidad del aire, con efectos negativos sobre la salud de los trabajadores y habitantes comunidades vecinas. La mayoría de florícolas están localizadas cerca de diferentes instituciones educativas, iglesias y lugares muy poblados (Acción Ecológica, 2000).

Así también, el agua está sometida a una exposición crónica con bajas dosis de plaguicidas, que afecta a la fauna acuática y terrestre. Cuando son transportadas, aguas abajo de los lugares donde fueron aplicado; pueden llegar hasta aguas subterráneas por lixiviación, y afectar a los reservorios de agua para consumo humano (Benitez, Sanchez, Balza, Yuri Molina, & Molina, 2015).

En el Ecuador, el cultivo de flores inicio a finales de los años 70 y su exportación comenzó en 1980, durante el Gobierno de Oswaldo Hurtado, en dicha época los empresarios vieron en los cultivos y exportación de flores un negocio muy rentable (Acción Ecológica, 2000).

Las principales provincias productoras de rosas se encuentran en la sierra. La provincia de pichincha posee un 77% de producción de rosas, seguida por Cotopaxi que posee un 12%, Imbabura se queda con un 4%, Azuay también tiene un porcentaje mínimo de 2% y otras provincias se quedan con un final de 5% (Corporación Financiera Nacional, 2017).

En la actualidad, el sector florícola utiliza grandes cantidades de plaguicidas para el control de diversas enfermedades y plagas, que afectan a la

productividad de los cultivos, generando pérdidas hasta en un 40% de la producción (Badii & Varela, 2008). Para el control de plagas a través de un manejo químico, los floricultores invierten aproximadamente 2.000 y 2.500 dólares por hectárea (Hidalgo L. , 2017). Por otro lado, se calcula que globalmente existen más de 100.000 toneladas de plaguicidas en los países en desarrollo (Mlato, Blanco , Estrada, & Bandala Erick, 2012). Gracias a las políticas de estímulos al desarrollo de la matriz productiva, en el 2015, las importaciones de plaguicidas desde China se incrementaron en un 34% (Naranjo, 2017).

En este contexto el presente estudio, pretende generar una propuesta de biorremediación de pesticidas empleando microorganismos autóctonos aislados de las zonas florícolas afectadas por pesticidas y evaluar la influencia de los humatos de Na y K sobre la tasa de degradación de pesticidas.

1.3. Hipotesis

1.3.1. Hipótesis nula:

- La tasa de degradación de pesticidas organofosforados varía en relación a las concentraciones de humato 7+ utilizado.
- La tasa de degradación de pesticidas organofosforados varía en relación a las especies microbianas empleadas.

1.3.2. Hipótesis alternativa:

- La tasa de degradación de pesticidas organofosforados no varía en relación a las concentraciones de humato 7+ utilizado.
- La tasa de degradación de pesticidas organofosforados no varía en relación a las especies microbianas empleadas.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General:

- Evaluar la influencia de humato 7+ en la degradación microbiana de pesticidas.

1.4.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar las bacterias del suelo en cultivos de flores.
- Determinar la capacidad de las bacterias edáficas para la degradación del Diazol (600 EC), mediante pruebas de absorbancia.
- Realizar el estudio cinético del proceso de biodegradación de Diazol (600 EC).

1.5. Justificación de la Investigación

Actualmente hay diversas estrategias para evitar el uso masivo de plaguicidas en el sector agrícola, tales como: el manejo integrado de plagas, el fomento y desarrollo de la agricultura orgánica, nuevas formas de producción, como la rotación de cultivos y empleo de biocontrol de plagas. Estas estrategias reducen el consumo de pesticidas, razón por la que deberían ser respaldadas con políticas estatales (Puerto, Suarez, & Palacio, 2014).

En el Ecuador algunas de las medianas empresas emplean biopesticidas para combatir las plagas que mejoran la producción y reducen el impacto ambiental; sin embargo los costos de estos tratamientos son elevados (Hidalgo L. , 2017). La FAO ha calculado que reducir una tonelada de plaguicida cuesta entre 3.500 a 4000 dólares para ello se crearon modificaciones en las prácticas agrícolas, uso de cultivos resistentes o control biológico de las plantas; sin embargo debido las políticas o cultura agrícola de los países en desarrollo no se as toma en cuenta. Existen distintas tecnologías para la degradación de pesticidas como: tratamientos físicos en los que se puede optar por la adsorción y filtros percoladores y también tratamientos biológicos y procesos avanzados de oxidación (Mlato, Blanco , Estrada, & Bandala Erick, 2012).

En el aspecto social la exposición al pesticida genera efectos negativos en el goce de derechos humanos de la sociedad, en particular el derecho a salud. La exposición los pesticidas puede ser a través de los alimentos, por agua, por aire o por contacto directo con los mismos, existen estudios que demuestran que la exposición a pesticidas causa cáncer, alzheimer, parkinson, trastornos

hormonales, esterilidad, efectos neurológicos, etc (Guanga, 2018). A través de técnicas de tratamiento de suelos contaminados se ayudaría a prevenir dichas enfermedades, preservando el derecho de la sociedad a la salud.

Por otro lado, en el ámbito ambiental en el 2014 se calculó que el 47% del territorio ecuatoriano presenta problemas de erosión del suelo que afecta a su capa principal, considerada la más fértil. El INIAP afirma que el 50% del suelo cultivado está alterado por este tipo de degradación de pesticidas (Guanga, 2018). Es por eso que la descontaminación del suelo permitirá que las comunidades de organismos que habitan en él puedan reconstituirse y de esta manera lleven a una regeneración físico química de las propiedades naturales del suelo, lo que a su vez genera un beneficio económico ya que el suelo recupera su fertilidad, por ende, la capacidad productiva.

2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Plaguicida

El término plaguicida se refiere a una sustancia o a la mezcla de varias, que se utiliza para prevenir, controlar o eliminar plagas, vectores de enfermedades que afectan a humanos y animales y otras especies indeseadas presentes en distintas plantas o animales que pueden ocasionar un efecto negativo permanente, interfiriendo en la producción agrícola (Ramírez & Lacasaña, 2001).

2.1.1. Clasificación de los Plaguicidas

Clasificación de los pesticidas según las siguientes características:

- a. La toxicidad.
- b. La vida media.
- c. La estructura química.

2.1.1.1. Por su toxicidad

Se puede medir el nivel de toxicidad del pesticida a través de la dosis letal media (DL_{50}) o a través de la concentración letal media (CL_{50}). Los factores mencionados anteriormente varían según las características del producto, ya que, este se puede comercializar en forma de sólido, gel, líquido, gas o polvo, depende también de la vía de ingreso que puede ser oral, dérmica o respiratoria. De igual manera el nivel temperatura, el estilo de alimentación, la edad y el sexo son determinantes que influyen en la variación de ambos factores. La clasificación de los plaguicidas según su toxicidad se puede observar en la siguiente tabla (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Tabla1.

Clasificación de los plaguicidas por su nivel de toxicidad, descrita en DL_{50} (mg/kg).

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligrosos	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrín, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano
Clase III	Ligeramente peligrosos	Malatión

Tomado de (Ramírez & Lacasaña, 2001).

2.1.1.2. Por su vida media

Dentro de la clasificación por vida media están los pesticidas permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Rathore & Nolle, 2014). Como se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 2.

Clasificación de los plaguicidas por su vida media efectiva.

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1-18 meses	Paratión, lannate
Persistente	más de 18 meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos obtenidos a partir de mercurio, plomo, arsénico

Tomado de (Rathore & Nollet, 2014).

- **Persistencia**

Hace referencia a la capacidad que posee una sustancia o un compuesto para perdurar en el ambiente, luego de haber cumplido el objetivo para el cual se lo empleo (Rathore & Nollet, 2014).

- **Vida Media**

Es el periodo de tiempo que se necesita para que la mitad de una sustancia o mezcla de sustancias se degraden (Rathore & Nollet, 2014).

2.1.1.3. Por su estructura química

La clasificación por estructura química se pueden observar en la tabla 3.

Tabla 3.

Clasificación de los plaguicidas, según su familia química.

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión, Diazinon
Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permethrin
Derivados bipyridilos	Clomequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

Tomado de (Rathore & Nollet, 2014)

2.2. Pesticidas Organofosforados

Los plaguicidas organofosforados constituyen un grupo amplio de compuestos de síntesis que por lo general son muy tóxicos, con antecedentes en los gases de guerra, muchas veces se los conoce como 'gases nerviosos', entre los que están el sarin, tabun y soman, y que se fabricaron especialmente para la Segunda Guerra Mundial (Obiols, 1999). Las propiedades que tienen estos compuestos como insecticidas fueron la razón de que en 1959 se hubieran sintetizado alrededor de 50.000 tipos, al identificar su utilidad en el control de plagas de insectos, por lo que, constituyen ingredientes principales de muchos

formulados comerciales (en los que se pueden encontrar diferentes componentes, para lograr mejores resultados del ingrediente activo (Obiols, 1999).

Dentro de los compuestos organofosforados se encuentran los ésteres, amidas o tioles que se derivan de los ácidos fosfóricos, fosfónico y fosfortoico, estructuralmente diversos. Su reactividad cambia de acuerdo a su estructura química; su principal modo de acción es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), que se encuentra en el nervioso central y periférico de los organismos vertebrados y su mecanismo fisiológico común es hidrolizar el neurotransmisor Acetilcolina (ACh). Algunos de estos plaguicidas han sido relacionados con toxicidad visual tanto en animales de laboratorio como en humanos que sufren de la Enfermedad de Saku. La toxicidad visual ocasiona que la retina y el nervio óptico se degeneren y del nervio óptico que puede como resultado a la exposición a organofosforados (López G. , 2016).

2.2.1. Estructura Química Organofosforados

Los Organofosforados se consideran elementos de alta toxicidad y se los considera compuestos liposolubles. Forman parte de distintas familias: fosfatos, fosfonatos, fosforoamidotioatos, fosforodiamidatos, varias de ellas azufradas (Ferrer, 2003).

La familia de los organofosforados constituye compuestos químicos orgánicos que se derivan del ácido fosfórico (unión de un ácido y un alcohol) y una diversidad de alcoholes (Fernandez, Mancipe , & Fernandez, 2010). Como se indica en la Figura 1.

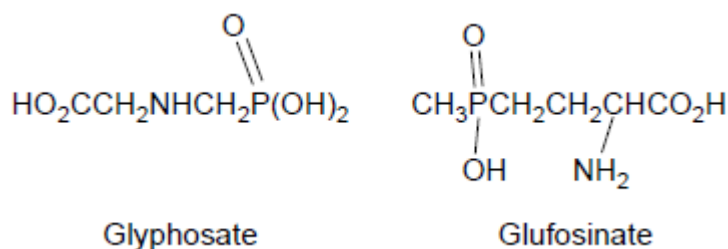


Figura 1. Estructura química de los organofosforados.

Tomado de (Curillo, 2015)

2.2.2. Modo de acción de los Organofosforados

Los organofosforados tienen el mismo modo de acción que los carbamatos, otro tipo de plaguicidas. Los organofosforados son ésteres de ácido fosfórico que al igual que los carbamatos tienen la capacidad de inhibir enzimas con capacidad esterásica, lo que quiere decir que inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, alterando el funcionamiento del sistema nervioso (Fernandez, Mancipe , & Fernandez, 2010).

2.2.3. Daños a la salud por Organofosforados

Los organofosforados causan distintas alteraciones en la salud, estas dependen de las vías de entrada del pesticida, estos pueden entrar al organismo a través de inhalación de vapores, vacíos o polvos, por absorción gastrointestinal y por penetración dérmica y de mucosas expuestas. La exposición con la piel se da prioritariamente a temperaturas altas y es mayor en presencia de dermatitis (Badii & Varela, 2008).

2.2.4. Propiedades de los Plaguicidas Organofosforados

2.2.4.1. Liposolubles

Esta propiedad posibilita su absorción, permitiendo que atraviese rápidamente las barreras biológicas (piel, mucosas), también facilita la entrada al Sistema.

2.2.4.2. Mediana tensión de vapor

Son volátiles facilitando la absorción por inhalación.

2.2.4.3. Degradables

En medios alcalinos, tierra y líquidos son se hidrolizan y no persisten en el ambiente (Badii & Varela, 2008).

2.2.5. Gama de Plaguicidas Organofosforados

Dentro de la gama de plaguicidas organofosforados se encuentran los insecticidas que se usan en los hogares que tienen componentes organofosforados a bajas concentraciones, por lo general del orden del 0.5% - 5% (Amer. & Aly , 2010). Su presentación es en forma de aerosoles y cintas repelentes como se puede observar en la tabla 4.

Tabla 4.

Principales Plaguicidas Organofosforados de Uso Doméstico.

Nombre Común	Nombre Comercial
• Azametiphos	• Snip
• Coumaphos	• Asuntol ,Cumafos
• Phorate	• Thimet
• Demetón-s-metil	• Systox
• Diazinón	• Basudin
• Disulfotón	• Disystón, Diazol
• Metamidofos	• Tamarón
• Monocrotophos	• Azodrin
• Malathion	• Belatión
• Metil Paratión	• Metilparatión, Folidol-
• P-nitrofenil tiofosfato	M
• Terbuphos	• Baythion
	• Counter

Tomado de (Amer. & Aly , 2010)

También se puede encontrar los plaguicidas que se emplean en el sector agrícola con un nivel alto de concentraciones que pueden variar desde 20% - 70% del principio activo. Se comercializan frecuentemente como líquido con distintos tipos de solventes, por lo general hidrocarburos resultantes del petróleo como tolueno, xileno, lo que ayuda a la absorción del principio activo. A este tipo de presentación se las conoce como concentrado emulsionable. También se comercializa en forma de sólidos, polvos, polvos humectables o gránulos, que poseen menor toxicidad debido a su presentación.

Los diferentes plaguicidas organofosforados se muestra en la tabla 5 (Amer. & Aly , 2010).

Tabla 5.

Principales Plaguicidas Organofosforados Utilizados en la Agricultura.

Tipo	Nombre Común	Nombre Comercial
I. No Sistémicos		
Dialquifosfatos	Diclorvos	"Lainsec", "Vapona"
Dimetil Tionofosfatos Fenólicos	Fenitrotión	"Sumithion", "Folithion",
	Metilparatión	"Folidol-M", "Metacide"
Dietil Tionofosfatos Fenólicos	Paratión	"Folidol"
Dialquil Tionofosfatos Heterociclicos	Clorpirifos	"Dursban", "Lorsban"
	Diazinón	"Basudin", "Diacide", "Diazil"
Dimetil Ditiolfosfatos	Fentoato	"Cidial", "Taonone"
	Malatión	"Malathion", "Cythion"
	Metilazinfos	"Guthion", "Gusathion").
Dietil Ditiolfosfatos	Carbofenotión	"Garrath", "Trithion"
Fosfonatos	Leptofos	"Phosvel", "Abar"

		Triclorfón	"Dipetrex", "Neguron", "Dyl ox"
II. Sistémicos			
Tiofosforil	Dialquil	Disulfón	"Disyston"
Tioeteres		Forato	"Thimet"
Tiofosforil	Dialquil	Metiloxidemotón	"Metasyst ox"
Sulfóxidos			
Tiofosforil	Dialquilsulfomas	Metildemetonsulfo	"Metalsosystoxsul"
Fosforil	Alquil Amidas	Monocrotofos	"Azodrin", "Nuvacron"
Tiofosforil	Alquilamidas	Dimetoato	"Cygon", "Perfektion",
Fosforilaquil	Carboxilatos	Mevinfos	"Phosdrin"
Amidofosfotiolatos		Metamidofos	"Monitor", "Tamarón"
III. Acaricidas Organofosforados			
Formetanato		Carbol	"Dicarzol"

Tomado de (Amer. & Aly , 2010)

2.3. Diazol, Pesticida utilizado para el estudio

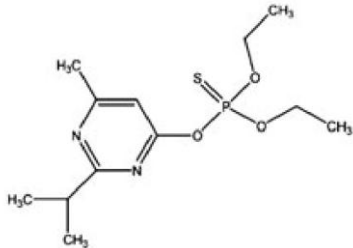
Se conoce al diazinón (nombre común) como Diazol (nombre comercial) un insecticida de contacto, actúa inhibiendo la acción de enzimas que contribuyen al buen funcionamiento del sistema nervioso, ocasionando posteriormente la muerte. El diazinón es considerado como ligeramente a moderadamente tóxico, lo que depende de su formulación.

El diazinón y otros pesticidas que se aplican directamente en el suelo o la vegetación, hacen contacto con el agua se descomponiéndose en otras sustancias. La vida media del diazinón en el suelo de 39 días. Muchos de los compuestos de pesticidas organofosforados sintéticos son muy tóxicos y son poderosos inhibidores de la acetilcolinesterasa, una enzima esencial para la vida que está involucrada en el proceso de neurotransmisión, como sustitutos de la acetilcolina (Amer. & Aly , 2010).

En la tabla 6 se encuentra información acerca de su estructura, fórmula molecular, etc.

Tabla 6.

Características químicas del diazinón.

Parámetros	Descripción
Estructura	
Fórmula Molecular	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$
Peso molecular (g/mol -1)	304.3
Densidad (g/mL-1) (20°C)	1.11
Solubilidad (mg/L-1) (20°C)	40

Tomado de (Kalantary, Shahamat, Farzadkia, Esrafil, & Asgharnia, 2014)

En Ecuador el diazinón, es comercializado por ADAMA Andina, la información complementaria sobre el componente activo y el tipo de cultivo se presenta a continuación en la siguiente tabla

Tabla 7.

Registro de información sobre el pesticida Diazol utilizado en la investigación.

PARAMETRO	DESCRIPCIÓN
Tipo de product	Insecticida de uso agrícola
Fromulación	Concentrado emulsionable
Ingrediente active	Diazinon
Concentración	600 gramos por litro
Categoría	II Moderadamente
Toxicológica	peligroso
Cultivo	Rosas, Arroz
	250 ml, 500 ml, 1 Lt, 200
Presentación	Lt
Grupo químico	Organofosforados

Tomado de (Adama, 2016).

2.3.1. Modo y Mecanismos de Acción

Modo de acción: es un insecticida cuyo modo de acción es por contacto, inhalación e ingestión. Su efecto residual es prolongado, aun en superficies muy absorbentes (Adama, 2016).

Mecanismo de acción: actúa inhibiendo a la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que hidroliza la neurotransmisora acetilcolina (ACh) durante las sinapsis colinérgicas y las uniones neuromusculares. Ocasionando la acumulación anormal de acetilcolina (ACh) en el sistema nervioso; lo que ocasiona la muerte por medio de la alteración de la neurotransmisión normal en el sistema nervioso del blanco biológico (Adama, 2016).

2.3.2. Manejo de Resistencia

Riesgo de resistencia: con el fin de disminuir los riesgos de resistencia y para un correcto manejo de las plagas es recomendable alternar Diazol con

plaguicidas que tengan mecanismos de acción diferentes, ya que el uso recurrente y/o una mala dosificación de un mismo plaguicida pueden producir biotipos de organismos resistentes al mismo (Mathews, 2006).

2.3.3. Características y Generalidades

El Diazol es un insecticida organofosforado con un amplio espectro, no sistémico, cuyo modo de acción es por contacto e ingestión, inhibiendo la colinesterasa. Dicho insecticida se utiliza para controlar insectos en el suelo. El Diazinon fue el primer pesticida organofosforado sintético que se registró en Estados Unidos en 1956; por lo que antiguamente constituía el ingrediente activo en productos domésticos que se usaban para combatir insectos tales como moscas, pulgas y cucarachas. La degradación microbiana de los suelos es la principal vía de absorción de Diazinon en el medio ambiente (Adama, 2016).

2.3.4. Compatibilidad

Presenta compatibilidad con muchos de los insecticidas, acaricidas y fungicidas. Por otro lado, no es compatible con productos que contengan cobre. Para mezclar con otros productos, es recomendable hacer una prueba a pequeña escala, para comprobar su compatibilidad física y Fito compatibilidad de la mezcla que se va a usar (Adama, 2016).

2.3.5. Biorremediación del diazinón (Diazol)

Por lo general, la degradación microbiana de este pesticida suele ser parcial, solo muy pocas cepas pueden degradarlo hasta dióxido de carbono, agua y energía. En presencia de la luz solar, se degrada en varios metabolitos intermedios. La interacción de raíces de plantas y microorganismos asociados, contribuye a su degradación completa influenciada por el contenido de materia orgánica del suelo, que lo inmoviliza (Mathews, 2006),

Notables influencias en la degradación ejercen los parámetros físico-químicos del suelo como pH, contenido de arcilla carga superficial, contenido de humedad, y permeabilidad.

El rol más importante, lo desempeña la materia orgánica, que participa en su retención o inmovilización y que se constituye en una condición indispensable para la biodegradación (Rathore & Nollet, 2014).

2.4. Rutas Metabólicas de degradación de los organofosforados

Las principales rutas de degradación de los pesticidas organofosforados son el hidrolisis, oxidación, alquilación y desalquilación. La hidrolisis de los enlaces PO- alquilo y P-O-arilo se genera por la degradación microbiana y esto se considera el paso más significativo con respecto a la desintoxicación de compuestos organofosforados. La enzima hidrolasa, es la responsable de catalizar esta reacción, la misma que se obtiene del aislamiento de los microorganismos del suelo (Hidrolasa organofosforada- OPH); esta enzima tiene alto grado de efectividad para degradar un gran rango de esteres organofosforados.

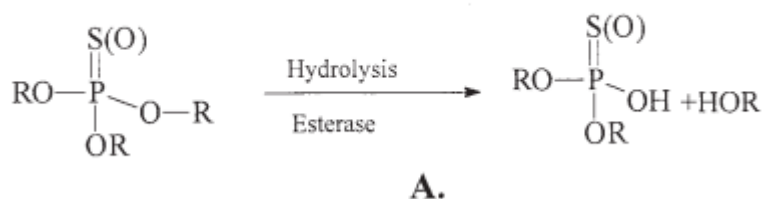


Figura 2. Reacción de hidrolisis compuestos organofosforados.

Tomado de (Rathore & Nollet, 2014)

2.5. Humatos

Los humatos son sales de ácidos húmicos y fúlvicos que se obtienen a partir de la lignina y ácidos húmicos que equivalen al 87% de sustancia biológica activa. Los humatos son compuestos solubles, ya que sus moléculas son abiertas; al contrario de los ácidos húmicos y fúlvico que son menos solubles debido a que sus moléculas son globulares, su solubilidad no sobrepasa el

45%, mientras que los humatos presentan hasta un 87-95% de solubilidad, por lo tanto, son más reactivos en el suelo. Por otro lado, los humatos inhiben el crecimiento de patógenos bacterianos y desarrollo de hongos, lo que a su vez disminuye los niveles de micotoxinas e incrementan la digestión de proteínas y calcio (Guzman, Paz, & Gualoto, 2012).

A través de la resonancia magnética nuclear se puede hacer un análisis detallado del contenido de grupos activos que se encuentran en los Humatos, que facilita su clasificación en cinco clases; que se presentan en la tabla.

Tabla 8.

Clasificación de los Humatos.

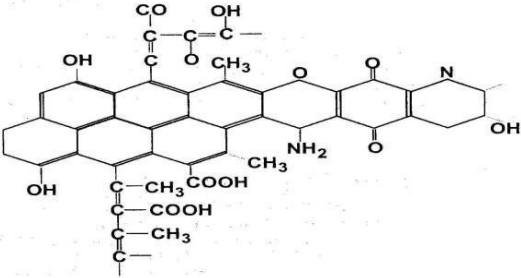
CLASE	DESCRIPCIÓN
Clase A	Poseen grupos carbonilos, carboxilos y quinonas.
Clase B	Fenolcarboxilos y átomos de carbono intercambiables por nitrógeno.
Clase C	Compuestos de la serie aromática y compuestos heterocíclicos.
Clase D	Átomos de carbono aromáticos protonizados.
Clase E	Grupos metílicos y metenílicos

Tomado de (Levinsky, 1998).

Los Humatos son compuestos orgánicos de alto peso molecular. En la siguiente tabla se muestra la Fórmula empírica y la estructura de los Humatos

Tabla 9.

Formula y estructura de los humatos.

Formula Empírica	Estructura
C₆₉O₂₀H₅₇N₂Si₄K₂CaNa₄SP	

Tomado de (Guzman, Paz, & Gualoto , 2012).

Gracias a la elevada actividad biológica de los humatos pueden interactuar con el agua, suelo, microorganismos edáficos y plantas. Al interactuar con el suelo, los humatos estimulan la retención de agua, respiración de la raíz y el desarrollo de microorganismos positivos para el mismo (en especial si el suelo es expuesto a la toxicidad de contaminantes) (Kochany & Smith, 2001).

Para incrementar la producción de suelos contaminados por metales pesados, controlar salinidad, sodicidad, pH extremo, bajo contenido de agua, temperaturas adversas y poca materia orgánica se utilizan los humatos de Sodio y Potasio (Lyons & Genc, 2016).

2.5.1. Humatos y el agua

Los humatos proveen de estructura al agua. En el intervalo de concentración de humatos 0,005– 0,009%, se ha detectado la amplificación de la señal de resonancia del oxígeno en la molécula de agua de 52,7 Hz hasta 103 Hz, por lo que se puede evidenciar estructuración del agua (Guzman, Paz, & Gualoto , 2012).

Según (Kochany & Smith, 2001) el sistema Humato – planta, está definido por dos fenómenos independientes para el crecimiento y desarrollo vegetal.

Primer fenómeno: Crecimiento de la energética celular e incremento del metabolismo

Segundo fenómeno: incremento de la permeabilidad de la membrana celular, que facilita el ingreso de sustancias nutritivas al interior de la célula acelerando la respiración vegetal.

2.5.2. Humato y suelo

Según (Kochany & Smith, 2001) los fenómenos que aparecen como resultado de la interacción de los humatos con suelo son varios, como, por ejemplo:

Los metales pesados como el Pb, Hg, Cr y Cd, junto con los humatos forman compuestos insolubles, creando una barrera a su ingreso en la célula. En tanto que, los microelementos necesarios, para el metabolismo microbiano y vegetal, forman con los humatos, quelatos complejos solubles. Esto es de vital importancia para la nutrición vegetal. Los humatos enlazan en complejos a iones de Fe y Al, cuya cantidad excesiva en el suelo, ejerce efectos negativos en la nutrición vegetal ligada al fósforo.

El Fe junto con los humatos forman complejos, y así se garantiza su transporte a las plantas, mientras que el Al, se enlaza en un compuesto insoluble, neutralizando así su efecto negativo sobre los fosfatos.

Los humatos al interactuar con el Ca, Mg, Al y Fe (componentes presentes en el suelo), forman puentes órgano-minerales que enlazan mecánicamente a las partículas del suelo en una estructura capaz de soportar la erosión, retener la humedad, el aire, y generar condiciones favorables para la actividad de los microorganismos.

2.5.3. Procesos en los cuales participan los Humatos

- **Formación de complejos órgano-minerales**

Los Humatos participan en reacciones de formación de complejos, según (Kochany & Smith, 2001) los mecanismos mediante los cuales los Humatos participan son:

- Intercambio iónico
- Absorción y complejación.
- Químio-absorción.

Formación de sales hétero polares complejas:

La presencia de sales de este tipo, cambia sensiblemente la solubilidad, distribución interface, migración y accesibilidad de los metales polivalentes para las plantas, en especial en aquellos suelos cuyas soluciones contienen cantidades importantes de sustancias orgánicas (Lyons & Genc, 2016).

Formación de sales heteropolares simples:

Se observa durante la interacción de los ácidos húmicos y sustancias húmicas con iones de metales alcalinos y alcalino-térreos, así como con los iones de amonio (Lyons & Genc, 2016).

Interacción de las sustancias húmicas con sustancias químicas y contaminantes:

Los ácidos húmicos y humatos al interaccionar con los componentes minerales del suelo en fase sólida, conforman en grado sumo sus cualidades absorbentes. En relación con esto, cualquier sustancia que ingrese desde el exterior, interacciona con las sustancias orgánicas tanto en la fase sólida como en la solución del suelo (Guzman, Paz, & Gualoto, 2012).

Las sustancias húmicas absorbidas impiden la interacción de agroquímicos y sustancias tóxicas con la parte mineral del suelo, disminuyendo la magnitud de fijación de fosfatos y algunos cationes.

Disminuye el traspaso de los fosfatos de los abonos, a formas poco solubles, como consecuencia de la interacción activa con cationes, que participan en la precipitación de fosfatos (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , y otros (Lyons & Genc, 2016).

2.5.4. Acción Protectora de Los Humatos

Según (Guzman, Paz, & Gualoto, 2012) la acción protectora de los humatos consiste en:

- Protección contra la radiación ionizante y sus efectos.
- Protección contra mezclas nocivas del aire atmosférico, suelo y aguas subterráneas en las zonas tecnogenas.
- Protección contra las consecuencias del empleo de agroquímicos en la agricultura.
- Protección contra factores ambientales desfavorables, en zonas de riesgo agrícola.
- Disminución del contenido de nitratos, formados por empleo de abonos nitrogenados.

2.5.5. Humatos y metales pesados

Los humatos tienen la capacidad de quelar metales pesados que se encuentran en los suelos, razón por la cual se los emplea en trabajos de remediación ambiental y descontaminación tecnógena de suelos (Lyons & Genc, 2016).

3. CAPITULO III. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizó el método experimental, con el fin de medir la degradabilidad de Diazol 600 EC (pesticida organofosforado), bajo la influencia de humato 7+ (sodio y potasio), con bacterias aisladas del suelo del sitio de estudio. Dicho proyecto se llevó a cabo en seis fases, de las cuales la primera parte se realizó en terrenos privados del barrio Lasso de la Parroquia Tanicuchi y los 5 restantes en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad de las Américas.

De este modo la primera parte consistió en la definición del punto de muestreo y la toma de muestras. Posteriormente, en la segunda fase se procedió con el aislamiento de bacterias edáficas obtenidas del suelo muestreado, a través de las diluciones del mismo y a una temperatura de 30 °C. En la tercera fase se realizaron ensayos de turbidez para identificar a las bacterias con mayor potencial de degradación de dicho contaminante. La cuarta fase abarcó la medición de absorbancia para determinar el índice de degradación del pesticida y un conteo bacteriano con el fin de corroborar resultados y verificar crecimiento de colonias. Finalmente, en la quinta fase se realizó la identificación bioquímica de las bacterias utilizadas para conocer su género.

Con la información obtenida y a través de distintas fórmulas se pudo determinar la cinética bacteriana, lo cual abarca la tasa de degradación del pesticida, su vida media, la eficiencia de degradación y el crecimiento bacteriano. Además, se utilizó el programa INFOSTAT para realizar un análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos.

En la figura 3 se muestra cada una de las fases que se llevaron a cabo durante la experimentación.

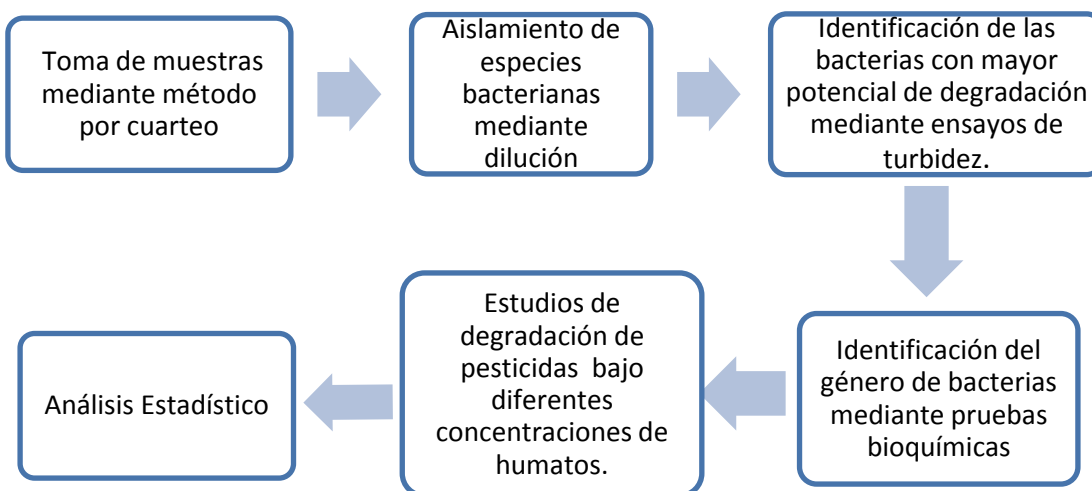


Figura 3. Diagrama de las fases del proyecto.

3.1. Toma de muestras de suelos

La toma de muestras de suelo se realizó en una finca privada destinada al cultivo de flores, localizada, en el Barrio Lasso de la Parroquia Tanicuchi de la provincia de Cotopaxi.

Para lograr la representatividad de las muestras se empleó la metodología de cuarteo, en la que se escogió tres cuadrantes de 45 m x 30 m de los invernaderos situados a los extremos de la propiedad y del céntrico. Con la ayuda de un barreno, se obtuvo 8 submuestras (200g c/u) de cada cuadrante a una profundidad de 15 cm, dando un total de 24 submuestras.

Cada submuestra se introdujo en una bolsa ziploc y después fueron mezcladas para homogenizar y distribuir las en un círculo que fue dividido en cuatro cuadrantes de las mismas proporciones, posteriormente se escogió dos cuadrantes opuestos hasta obtener una muestra compuesta de 1 Kg de suelo.

3.2. Siembra y aislamiento de especies bacterianas

Para la siembra se empleó 1 gramo de suelo, que se diluyó en 10 ml de agua destilada. De esta solución materna, se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} . La siembra se realizó en cajas petri con agar nutritivo marca Difco. Se tomaron 5 μ L de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} y se extendieron con el aza de Dirgalsky. Las siembras se cultivaron durante 24- 48 horas, bajo la temperatura de 30 °C.

Transcurridos dos días; con ayuda del equipo Colony Counter digital se realizó el conteo de colonias medidas en UFC's, presentes en cada caja petri y se identificó la diversidad de colonias con morfología distinta. De cada colonia con morfología diferente, se realizó un cultivo de propagación en medio de agua peptonada, con las cuales se procedió a la ejecución de pruebas de turbiedad.

3.3. Identificación de los microorganismos

Para identificar los microorganismos se realizó tinción de Gram y de esta manera se determinó la morfología de las colonias seleccionadas, la misma que consiste en tomar parte de las especies seleccionadas y colocarlas en

placas porta objetos, para luego ser sometidas a una serie de reactivos (Violeta de genciana, lugol, alcohol cetona y safranina), lo que permitió determinar si la colonia es gram positiva o gram negativa.

3.4. Determinación de la eficiencia de las especies aisladas mediante ensayos de turbidez.

Para el ensayo de turbidez se inoculo cada colonia, en un tubo de ensayo con agua peptonada, a esta mezcla se añadió 1 ml del pesticida (Diazol 600 EC) cuya concentración es de 0,0284 g/L.

Los tubos se incubaron durante 48 horas a 30°C. Toda muestra que presentó turbidez fue considerada positiva.

3.4.1. Selección de las especies experimentales

Toda muestra positiva se sometió a medición de turbidez mediante espectrofotometría en unidades nefelométricas de turbidez (NTU's), cada 24 horas durante 3 días. Al finalizar este ensayo, se seleccionaron las especies con mejores índices de turbidez, las cuales posteriormente fueron sometidas a ensayos de degradación del pesticida Diazol 600 EC.

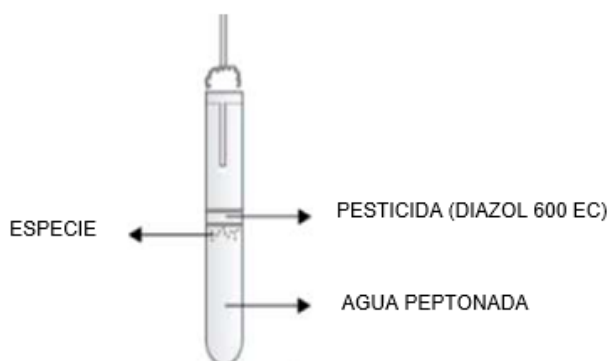


Figura 4. Esquema de ensayo de turbidez para cada especie, por duplicado.

3.5. Identificación bioquímica de las especies

Para la identificación bioquímica de las especies como primera fase se realizó pruebas de oxidasa y catalasa.

Según (Rodriguez, 2007) las pruebas de oxidasa y catalasa se realizan de la siguiente manera.

- Prueba Oxidasa:

Esta prueba ayuda a determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se produce por la presencia de un sistema citocromooxidasa que es aquella que activa la oxidación del citocromo, el mismo que es reducido por el oxígeno molecular que produce el peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa.

Para realizar esta prueba se usó un inóculo de 12-24 horas máximo. Se tomó con un asa una pequeña cantidad de la colonia y se la froto sobre un papel filtro impregnado con una solución acuosa de tetramethyl-pphenylenediamina de hidrócloruro al 1 % (preparación fresca).

- Prueba Catalasa:

La enzima catalasa se encuentra presente en muchos microorganismos aeróbicos. La prueba de catalasa se basa en la capacidad que tienen los microorganismos catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada (peróxido de hidrógeno), en agua y oxígeno.

Para ésta prueba se utilizaron cultivos jóvenes (12-24 horas) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Si se producen burbujas de gas indica que la reacción es

positiva, mientras que si no se producen burbujas es negativa, el procedimiento se realiza de esta manera: añadiendo una pequeña cantidad de colonias bacterianas con una gota de H_2O_2 sobre una tira portaobjetos limpia.

Una vez realizadas estas pruebas se enviaron cada una de las especies al laboratorio de la Universidad Católica del Ecuador, llamado Diserlab, para la identificación de las mismas mediante pruebas bioquímica.

3.6. Ensayos de degradación de Diazol 600 EC

De las especies positivas se escogieron 2 con mayor turbidez. Las pruebas se ejecutaron empleando Diazol 600 EC a una concentración de 0.0284 g/L, solución bacteriana de las especies seleccionadas y dos concentraciones de humato 7+ al 0,01 y 0,5% y solución mineral de marca Difco Bushnel.

3.6.1. Variables Independientes.

Tabla 10.

Variables independientes.

Factores	Niveles	Tratamiento	Repeticiones
Especies	A	T1 (A+C1)	2 erlenmeyer x tratamiento
	B	T2 (A+C2)	
Humato	C1: 0,01%	T3 (B+C1)	
	C2: 0,5 %	T4 (B+C2)	
Testigo	A	T5 (A)	
	B	T6 (B)	
Blanco	BL	T7 (BL)	

3.6.2. Variables Dependientes

- Absorbancia se mide en (nm)
- Conteo de numero de bacterias (UFC's)

3.6.2.1. Medición de la absorbancia de las unidades experimentales

La medición de la absorbancia de las unidades experimentales se efectuó bajo tres longitudes de onda, para la concentración de humato 0.01 % fue de 258 nm, para la de 0.5 % de 224 nm y para el testigo y el blanco de 240 nm, en el espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis marca Thermo Scientific, durante 30 días cada tres días.

3.6.2.2. Conteo bacteriano

Para Realizar el conteo bacteriano se utilizó el equipo Colony Counter Digital, donde se dividió la caja Petri en cuatro zonas iguales para obtener el total de colonias existentes en uno de los cuadrantes, y posteriormente obtener el número total de las colonias existentes en la caja petri.

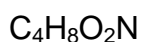
3.6.6.3. Tratamientos

Los tratamientos utilizados para verificar la degradación del pesticida (Diazol) se realizaron en matraz Erlenmeyer de 125 ml los cuales contienen 90 ml de medio mineral, 3 ml de bacteria, 3 ml de Humato 7+ con sus dos concentraciones distintas y a su vez 2 ml de pesticida (Diazol 600 EC), con un testigo que posee 90 ml de medio mineral, 3 ml de bacteria y 2 ml de pesticida, también se realizó un blanco que contiene 90 ml de medio mineral, 3 ml de suelo diluido (10^{-3}) y 2 ml de pesticida (Diazol 600 EC).

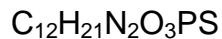
3.7. Determinación de parámetros cinéticos del proceso de degradación de Diazol 600 EC

Para calcular los parámetros cinéticos se transformaron los resultados de nm a concentración mediante la fórmula de la Ley de Lambert-Beer. Para el efecto se tomó en cuenta, la fórmula celular, la fórmula del pesticida, la absorbatibilidad específica del pesticida y de la bacteria empleada.

a) Fórmula celular



b) Fórmula del pesticida



c) Absorbancia específica del pesticida

$$\varepsilon=0.004$$

d) Absorbancia específica de la bacteria

$$\text{Especie A } \varepsilon=0.43$$

$$\text{ESPECIE B } \varepsilon=0.38$$

e) Fórmula de Lambert Beer.

$$A = \varepsilon \cdot B \cdot C$$

Dónde:

A es absorbancia de la muestra.

ε es Absorbancia molar constante para cada especie.

B es la longitud del paso óptico del contenedor de la muestra.

C es la concentración del pesticida.

Los parámetros cinéticos que se determinaron son: Tasa de crecimiento microbiano (μ), tasa de biodegradación del pesticida (k), Tiempo de vida media del pesticida (t) y eficiencia en porcentaje.

- **Tasa de crecimiento y conteo microbiano**

Para determinar la tasa de crecimiento microbiano se realizaron dos procedimientos. El primero a través de los resultados obtenidos de las mediciones de absorbancia, que muestra el incremento periódico de los microorganismos y el segundo mediante el conteo de colonias.

La determinación de la tasa de crecimiento microbiano se efectuó con ayuda de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_2) - \text{Ln}(N_1)}{t_2 - t_1}$$

Dónde:

μ es es tasa de crecimiento microbiano

N_1 es el número de UFC's/ml al t_1 de 4 horas,

N_2 es el número de UFC's/mL al t_2 de 24 horas.

- **Tasa de degradación de pesticida**

La tasa de degradación de pesticidas se realizó a partir de los datos absorbancia, transformados a valores de concentración, empleando la fórmula modificada de Monod:

$$\frac{\text{Ln}C_0}{C} = \frac{m \text{Max.} B_0}{Y * t} = kt$$

$$kt = \frac{\text{ln}C_0}{C}$$

Dónde:

K , se calculará mediante la ecuación de la pendiente:

$$K = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

- **Tiempo de vida media**

El tiempo de vida media se determinó por la ecuación:

$$t = \frac{\text{ln}(0,5)}{k}$$

Dónde:

t es el tiempo de vida media.

K es la tasa de degradación del pesticida

- **Eficiencia en porcentaje (Y).**

La eficiencia se determinó en términos de porcentaje:

$$Y = \frac{Cf \times 100}{Co}$$

Dónde:

Cf es la concentración final que se obtuvo del pesticida y Co es la concentración inicial del mismo.

3.8. Análisis de resultados

Para el estudio se utilizó el programa INFOSTAT, donde se estudió la eficiencia y las diferencias significativas entre los tratamientos (especies y concentraciones de humato), complementando con pruebas Normalidad (Shapiro y Wilks) y con pruebas ANOVA de Tukey.

El análisis de varianza (ANOVA) se refiere a un método de modelado lineal para evaluar la relación entre campos. Para los controladores clave, ANOVA prueba si el valor objetivo de media varía entre combinaciones de categorías de dos entradas. Si la variación es significativa, existe un efecto de interacción.

Para probar si las medias son diferentes, una prueba ANOVA compara la varianza explicada (provocada por los campos de entrada) con la varianza no explicada (provocada por el origen del error). Si la proporción de la varianza explicada con la varianza no explicada es alta, las medias son estadísticamente diferentes.










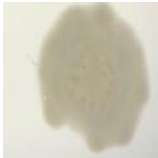


4. CAPITULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Aislamiento de especies microbianas

Cuantitativamente la dilución 10-3 generó 192 UFC's y la dilución 10-5 96 UFC's. Cualitativamente; en la dilución 10-3 y 10-5 se identificaron 12 colonias con morfología diferente.

Tabla 11.

Morfología de colonias

Especies			
A	B	C	D
			
E	F	G	H
			
I	J	K	L
			

Durante la investigación se aislaron 12 colonias. Según Ferrer y Alarcón citado en (López, 2014) mediante el aislamiento de especies por dilución se pueden identificar las bacterias que por lo general se encuentran presentes en los suelos y estas son: Pseudomonas, Cellulomonas, Acinetobacter, Staphylococcus, Hiphomicrobuim, Xanyhomonas, Alcaligenes, Bacillus, Brevibacterium, Metallogenium y Streptococcus.

4.2. Ensayos de turbidez

Las pruebas de turbidez se realizaron con 6 especies de morfología diferente que generaron los siguientes resultados:

Tabla 12.

Turbidez de las especies aisladas (NTU's).

Especies	(NTU's)
A	1574,87
B	1551,57
C	1464,05
D	1395,5
E	1431,62
F	1461,335

A partir de las pruebas de turbidez se escogieron las especies con los mejores

resultados, estos fueron la A con 1574,87 NTU's y la B con 1551,6 NTU's lo que significa que dichas especies tienen mayor concentración bacteriana.

Según (Guerra & Reinoso, 2016) la luz absorbida mediante turbidez es directamente proporcional a la concentración bacteriana, es decir la disminución de luz significará que existe un incremento de sólidos suspendidos en el líquido, lo que en este caso demuestra que existe un aumento de concentración bacteriana.

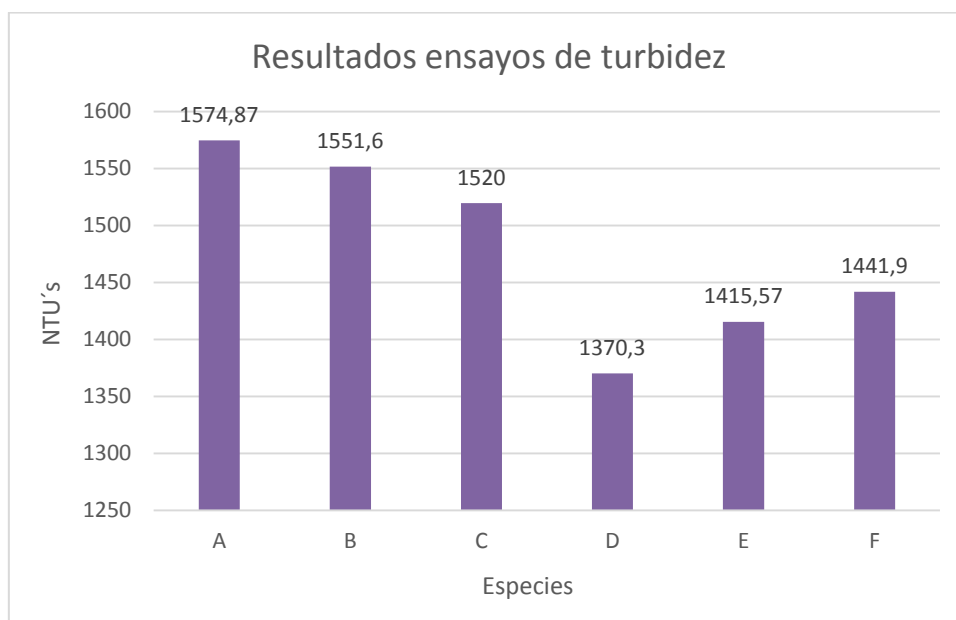




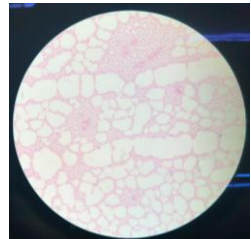


Figura 5. Resultados ensayos de turbidez.

Con los resultados se puede evidenciar que todas las colonias obtenidas del suelo de cultivo de flores tienen la capacidad de degradar pesticidas organofosforados, como Diazol 600 EC, en especial las especies A y B como se muestra en la figura 5.

Tabla 13.

Morfología de las especies

Referencia de la Colonia	Morfología	Foto
Cepa A	Diplobacilos gram positivos	
Cepa B	Estreptobacilos esporulados metacéntricos gram positivos	
Cepa C	Bacilos gram positivos	
Cepa D	Bacilos gram negativos	
Cepa E	Bacilos gram negativos	

Cepa F

Estreptococos gram positivos
esporulados

Las especies que mostraron mejores resultados de turbidez fueron la A y B, por ende, a ellas se les someterá a ensayos de degradación.

4.3. Identificación bioquímica de las especies

Los resultados para las pruebas de catalasa fueron positivos y negativos para oxidasa. En cuanto a la identificación bioquímica de las especies se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 14.

Identificación de las especies.

Taxonomía	A	B
Dominio	Bacteria	Bacteria
Filo	Firmicutes	Firmicutes
Clase	Bacilo	Bacilli
Orden	Bacillales	Bacillales
Familia	Basillaceae	Basillaceae
Género	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>megaterium</i>	<i>thuringiensis</i>

Especie A (*Bacillus megaterium*)

En la cepa A se identificó que es una *Bacillus megaterium* Gram Positiva que según (Sosa, Pazos, Torres , & Casadesús, 2011) presenta un porcentaje de

confiabilidad de crecimiento de un 99.2 % en condiciones anaerobias y a distintas temperaturas, lo que demuestra que es una bacteria con una alta capacidad de crecimiento.

Especie B (*Bacillus thuringiensis*)

Por otro lado, se identificó que la cepa B es una *Bacillus thuringiensis* que según (Garrity, Bell, & Lilburn, 2004) son bacterias anaerobias facultativas, gram positivas que se presentan de forma individual, en pares o en cadenas. También forman esporas elipsoidales, a veces cilíndricas. Crecen en un rango de temperatura entre 10–15 ° C, y la máxima de 40–45 ° C, cabe mencionar que son oxidasa negativa y catalasa positiva.

A su vez (Ledesma, 2015) muestra que esta bacteria es utilizada como insecticida natural, ya que inactiva a las larvas afectadas y estas dejarán de alimentarse por ende es necesario estudiar esta bacteria si se la podría utilizar como un controlador de plagas natural y como se mencionó anteriormente tiene una alta capacidad degradadora.

4.4. Ensayos de degradación de Diazol utilizando las especies seleccionadas

Tabla 15.

Resultados de absorbancia de Bacillus megaterium.

Días	<i>Bacillus megaterium</i>			<i>Bacillus thuringiensis</i>			
	Humato (0,01%)	Humato (0,5%)	Testigo (SH)	Humato (0,01%)	Humato (0,5%)	Testigo (SH)	Blanco (BL)
Día 1	0,014	0,0355	0,012	0,036	0,0425	0,012	0,024
Día 3	0,059	0,0395	0,022	0,052	0,0515	0,022	0,056
Día	0,074	0,0485	0,03	0,068	0,098	0,03	0,069

6							
Día 9	0,1115	0,073	0,034	0,076	0,106	0,034	0,083
Día 12	0,115	0,1015	0,044	0,0805	0,111	0,044	0,079
Día 15	0,1215	0,11	0,0515	0,087	0,113	0,0515	0,065
Día 18	0,1445	0,115	0,0575	0,088	0,12	0,0575	0,089
Día 21	0,149	0,1485	0,06	0,088	0,1455	0,06	0,083
Día 24	0,15	0,161	0,067	0,1005	0,159	0,067	0,082
Día 27	0,153	0,1855	0,067	0,1175	0,1665	0,067	0,085
Día 30	0,1555	0,193	0,0715	0,168	0,222	0,0715	0,088

En la tabla 15, se muestra los resultados de absorbancia medida para las distintas concentraciones de humato (0.01% y 0.5%) durante 30 días con intervalos de 3 días, donde claramente los días con mayor absorbancia registrada fue el día 30 para los ensayos con *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*, mientras que para el blanco el día de mayor absorbancia fue el día 18. Cabe recalcar que la especie *Bacillus thuringiensis* a la concentración 0.5% de humato tiene una absorbancia mayor.

Si se compara entre las dos especies estudiadas, fue *Bacillus thuringiensis* la que presentó mejores resultados de absorbancia con 0.222 nm, por ende, es más eficiente para desarrollarse en el medio contaminado con pesticida que la *Bacillus megaterium* que presento una absorbancia de 0.193 nm.

4.4.1. Pruebas de degradación del pesticida con *Bacillus megaterium* y

Bacillus thuringiensis

Tabla 16.

Valores de disminución de Carbono del pesticida.

<i>Bacillus megaterium</i>			<i>Bacillus thuringiensis</i>			Blanco
Humato 0,01%	Humato 0,5%	SH	Humato 0,01	Humato 0,5	SH	
g C Pesti	g C Pesti	g C Pesti	g C Pesti	g C Pesti	g C Pesti	g C Pesti
0,027	0,024	0,027	0,024	0,023	0,027	0.026
0,021	0,024	0,026	0,021	0,021	0,025	0.021
0,019	0,022	0,025	0,019	0,015	0,024	0.019
0,015	0,02	0,024	0,018	0,014	0,024	0.018
0,014	0,016	0,023	0,018	0,014	0,022	0.018
0,014	0,015	0,022	0,017	0,013	0,021	0.020
0,011	0,014	0,021	0,017	0,012	0,021	0.017
0,01	0,01	0,021	0,017	0,009	0,02	0.018
0,01	0,009	0,02	0,015	0,007	0,019	0.018
0,01	0,006	0,02	0,013	0,006	0,019	0.017
0,009	0,004	0,02	0,006	0,001	0,019	0.017

En la tabla 16, se puede observar la disminución de la concentración de carbono del pesticida. Claramente a la concentración 0.5% de humato la especie *Bacillus thuringiensis* tiene una mayor eficiencia para degradar el pesticida debido a que el carbono paso de 0.023 g en el día 1 a 0.001 g en el día 30, mientras que *Bacillus megaterium* llega únicamente hasta 0.004 g de carbono en el día 30, por lo que se puede evidenciar que la concentración de humato mencionada anteriormente ayuda a la especie *Bacillus thuringiensis* a tener una mayor capacidad de disminuir el carbono del pesticida. Por otro lado, se puede observar que en el testigo (sin humato) y el blanco la disminución no

es muy notable, ya que para *Bacillus megaterium* se reduce hasta 0.02 g de carbono al día 30 y para *Bacillus thuringiensis* hasta 0.019 g.

Dónde:

(0.01) Es la primera concentración de Humato

(0.5) Es la segunda concentración de Humato

(SH) Es el testigo que no contiene Humato

(gC pesti) Determina la disminución de carbono que tiene el pesticida en su contenido.

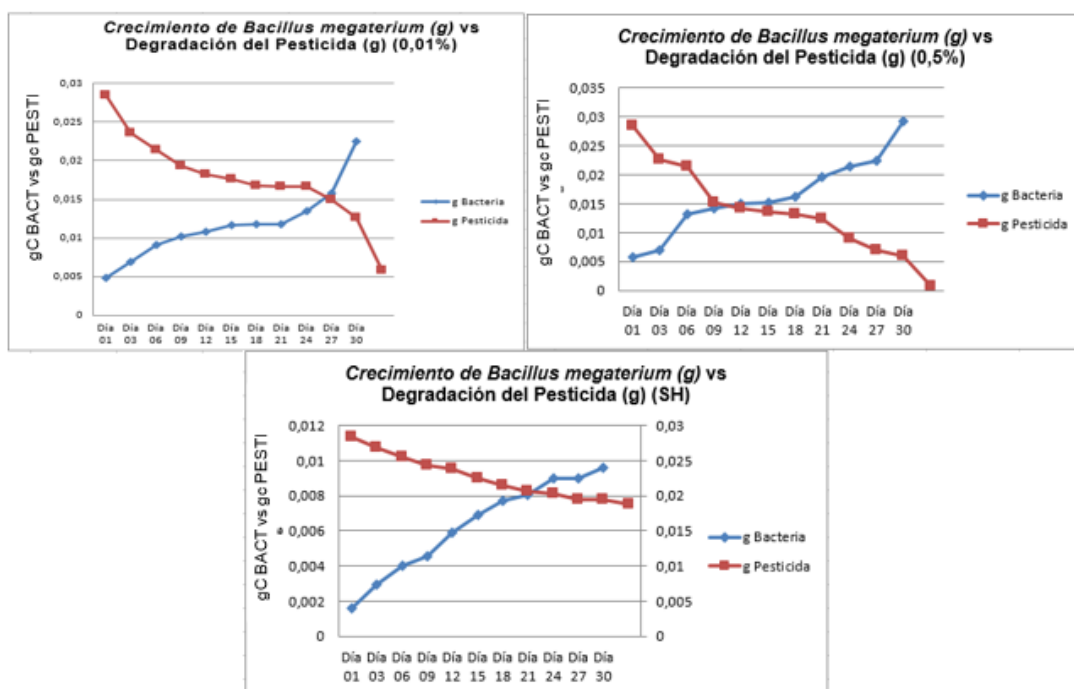


Figura 6. Tasa de crecimiento de la bacteria en gramos frente a la degradación de pesticida en gramos de la especie *Bacillus megaterium*.

El comparar la curva de crecimiento microbiano vs la curva de degradación del

pesticida es un mecanismo para evidenciar la degradación, donde se espera obtener una relación inversamente proporcional. Mientras asciende la curva de crecimiento, la curva de concentración del pesticida decrece.

En la figura 6 se muestra la comparación de las dos concentraciones de humato con el pesticida empleado (Diazol 600 EC), junto con el testigo que no contiene humato, donde se puede observar que la concentración al 0.5% de humato el crecimiento bacteriano es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende, es similar a la curva teórica y se puede decir que *Bacillus megaterium* es eficiente para la degradación del pesticida, también con la concentración 0.01% indica un crecimiento y decrecimiento inversamente proporcional pero hasta el día 30 llega hasta 0.023 g de bacteria, a diferencia que en la concentración 0.5% al día 30 logra llegar hasta el 0.03 g de bacteria, por aquellos resultados se muestra a esta concentración como la mejor para degradar Diazol. Sin embargo, también se puede observar al ensayo que no posee humato y se evidencia que la degradación es mucho más demorada ya que al día 30 llega a 0.01 o inferior y el decrecimiento de g de C del pesticida también es demorado por lo que se puede inferir a que el Humato 7+ si influye de manera positiva en la degradación de pesticidas.

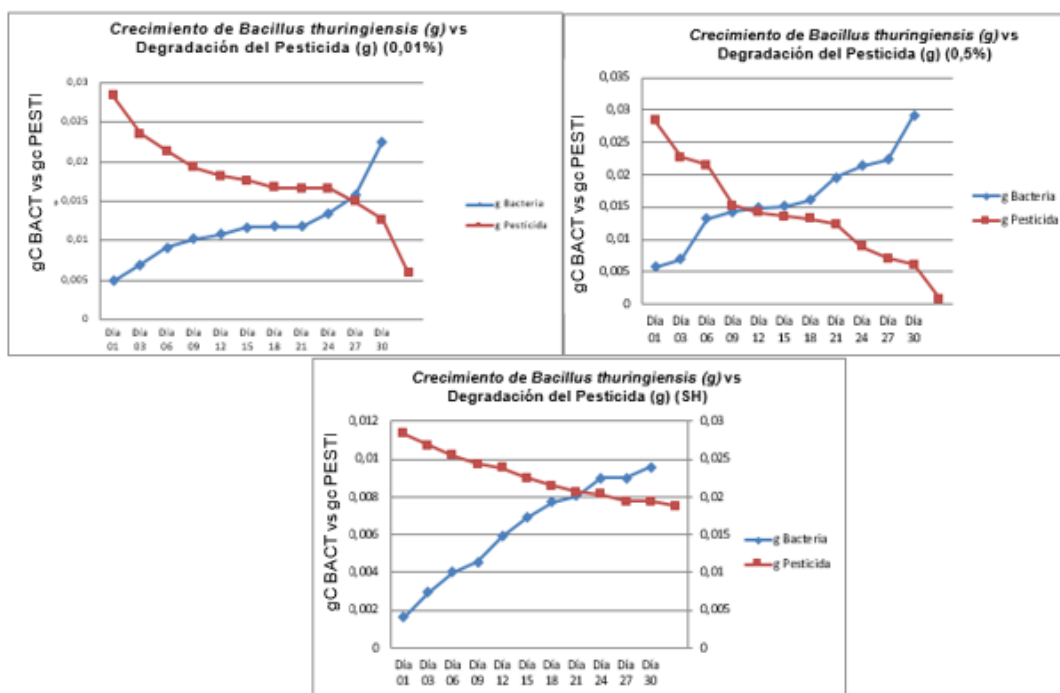


Figura 7. Tasa de crecimiento de la bacteria en gramos frente a la degradación de pesticida en gramos especie *Bacillus thuringiensis*.

En esta figura se muestra claramente que el crecimiento de la bacteria es inversamente proporcional a la de gradación del pesticida, se puede determinar que en la concentración 0,01 % en la especie *Bacillus thuringiensis* es eficiente para la degradación de pesticida, mientras que en la concentración al 0.5% de humato también el crecimiento bacteriano es inversamente proporcional al de la degradación del pesticida, por ende, es similar a la curva teórica y se puede decir que *Bacillus thuringiensis* es eficiente para la degradación del pesticida, al día 30 logra llegar hasta el 0.03 g de bacteria e incrementa, por aquellos resultados se muestra a esta concentración como la mejor para degradar Diazol 600 EC; sin embargo también se puede observar al ensayo que no posee humato y se evidencia que la degradación es mucho más demorada ya que al día 30 llega a 0.01 e inferior y el decrecimiento de g de C del pesticida también es demorado por lo que se puede inferir a que el Humato 7+ si influye de manera positiva en la degradación de pesticidas.

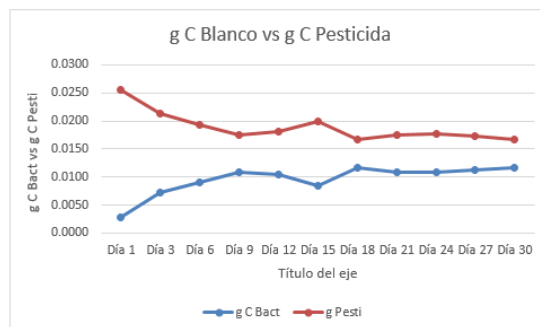


Figura 8. Tasa de crecimiento de las bacterias en gramos frente a la degradación de pesticida en gramos Blanco.

La figura 8 muestra que las bacterias presentes en el blanco tienen un crecimiento lento ya que desde el día 18 el crecimiento comienza a ser constante y la degradación de los gramos de pesticida tienen un similar decrecimiento, sin embargo, no cumplen con la ley de la curva teórica ya que su crecimiento no es inversamente proporcional.

Con los resultados de tasa de crecimiento bacteriano se puede determinar que las dos especies *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis* que contienen humato muestran resultados similares en cuanto al crecimiento microbiano y degradación de pesticida, sin embargo, los testigos de estas especies que no contienen humato, incluyendo al blanco muestran resultados inferiores para degradación de pesticidas y crecimiento bacteriano. Según (Sarrade & Yanez, 2017) en su investigación demostraron que mediante un conteo de UFC's, la cantidad de UFC's bajo significativamente en los tratamientos sin humato.

4.4.2. Tasa de crecimiento microbiano

Tabla 17.

Valores del conteo microbiano.

Conteo microbiano								
	Horas	4 horas			24 horas			Unidad
	Especie	<i>Bm</i>	<i>Bt</i>	BL	<i>Bm</i>	<i>Bt</i>	BL	
Concentración	0,01	59	78		476	576		UFC's
	0,5	75	76	17	576	732	122	UFC's
	SH	42	67		276	368		UFC's

En cuanto al conteo microbiano se puede determinar que el crecimiento es mayor para la especie *Bacillus thuringiensis* frente a la especie *Bacillus megaterium* tanto en la primera como en la segunda lectura.

Donde:

Bm es *Bacillus megaterium*

Bt es *Bacillus thuringiensis*

Tabla 18.

Valores de tasa de crecimiento microbiano.

Tasa de crecimiento				
	Especie	<i>Bm</i>	<i>Bt</i>	BL
Concentración	0,01	0,104394	0,09997	
	0,5	0,101931	0,113252	0,0991
	SH	0,094137	0,08517	

Se puede observar que la concentración 0.5 % de humato es más eficiente para el crecimiento bacteriano; en especial para *Bacillus thuringiensis*, ya que presenta un valor del 10% mayor de crecimiento bacteriano. También se puede observar que el blanco tiene un alto crecimiento microbiano y esto se debe a que tiene más de una, dos o tres especies en su composición.

Donde:

Bm es *Bacillus megaterium*

Bt es *Bacillus thuringiensis*

BL es el blanco

4.4.3. Tasa de degradación de diazol

Tabla 19.

Valores de tasa de degradación del pesticida con *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*.

<i>Bacillus megaterium</i>			<i>Bacillus thuringiensis</i>			
kt=LN(Co /C)	kt=LN(Co /C)	kt=LN(Co /C)	kt=LN(Co /C)	kt=LN(Co /C)	kt=LN(Co /C)	kt=LN(Co /C)
Humato (0.01)	Humato (0.5)	Sin Humato	Humato (0.01)	Humato (0.5)	Sin Humato	Blanco
0,062	0,165	0,053	0,1864	0,2241	0,0584	0.053
0,291	0,185	0,099	0,2819	0,2788	0,1097	0.099
0,381	0,233	0,138	0,3874	0,6216	0,1528	0.138
0,650	0,375	0,157	0,4447	0,6946	0,1751	0.157
0,679	0,571	0,209	0,4785	0,7430	0,2330	0.209

0,735	0,637	0,249	0,5293	0,7631	0,2788	0.249
0,965	0,679	0,283	0,5373	0,8367	0,3169	0.283
1,017	1,011	0,297	0,5373	1,1625	0,3333	0.297
1,029	1,170	0,338	0,6439	1,3906	0,3805	0.338
1,066	1,583	0,338	0,8098	1,5441	0,3805	0.338
1,097	1,659	0,366	1,5779	3.52	0,4121	0.366

Dónde:

kt es la tasa de degradación del pesticida (g de Pesticida/Día).

Se puede determinar que las especies *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis* muestran una tasa de degradación del pesticida importante con la concentración 0.5% de humato 7+, teniendo en cuenta que *Bacillus thuringiensis* presenta un un 47% más de degradación de Diazol 600 EC frente a *Bacillus megaterium*, a su vez se puede ver que el testigo que no posee humato n degrada de la misma manera que los que contienen humato ya que sus valores son bajos 0.366 g para *Bacillus megaterium* y 0.4121 g para *Bacillus thuringiensis*, también se pude corroborar que el humato es importante ya que el blanco realizado que tampoco contiene humato presenta 0.366 g de pesticida lo cual muestra que es una tasa de degradación inferior a las demás, por lo que se recalca que el humato 7+ es de gran importancia como aportador de nutrientes a las especies utilizadas.

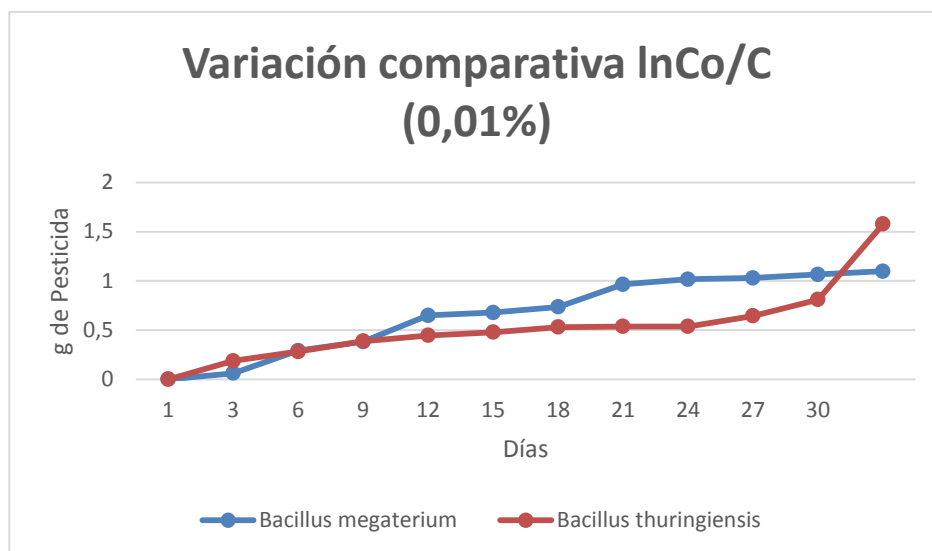


Figura 9. Resultados comparativos tasa de degradación de Diazol con *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*, con la concentración 0.01% de Humato 7+

Del día 1 al 9 se puede observar que ambas especies tienen una tasa de degradación similar, sin embargo en el día 12 *Bacillus megaterium* incrementa su tasa de degradación a 0.6 g mientras que *Bacillus thuringiensis* permanece con 0.4 g, manteniendo esta misma tendencia hasta el día 30 donde *Bacillus thuringiensis* muestra un incremento notable de degradación con 1.6 g en relación a *Bacillus megaterium* que permanece en la misma tendencia y se ubica por debajo de 1.2 g de degradación del pesticida.

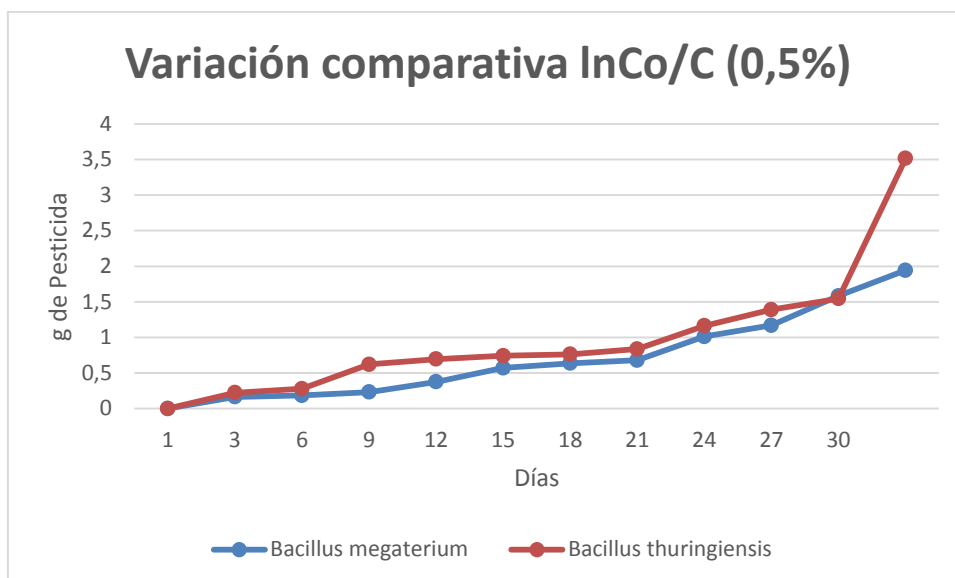


Figura 10. Resultados tasa de degradación. Especie *Bacillus megaterium* vs. *Bacillus thuringiensis* con la concentración 0.5% de Humato 7+.

Se puede observar que del día 1 al 27 tanto *Bacillus thuringiensis* como *Bacillus megaterium* muestran una tendencia similar en cuanto a la tasa de degradación del pesticida con valores de degradación que oscilan entre 1 y 1.5 g. Sin embargo, en el día 30 *Bacillus thuringiensis* degrada 3.5 g de pesticida, mostrando un índice de degradación superior a *Bacillus megaterium* que degrada 2 g de pesticida.

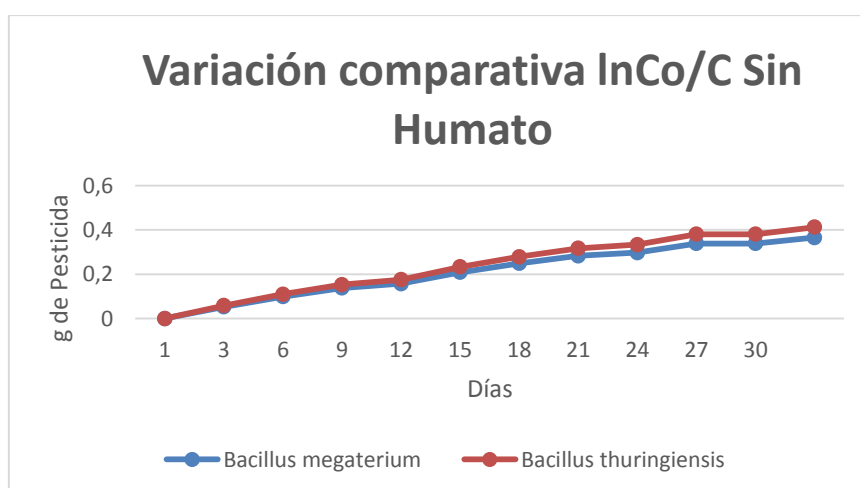


Figura 11. Resultados tasa de degradación. Especie *Bacillus megaterium* vs. *Bacillus thuringiensis*, sin Humato 7+

Se puede observar que *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus megaterium* muestran un índice de degradación de pesticida similar durante los 27 días, ya en el día 30 existe una ligera variación donde *Bacillus thuringiensis* incrementa su tasa de degradación de pesticida a 0.4 g, mientras que *Bacillus megaterium* permanece por debajo llegando a degradar 0.35 g de pesticida, sin embargo no es un aumento muy significativo.

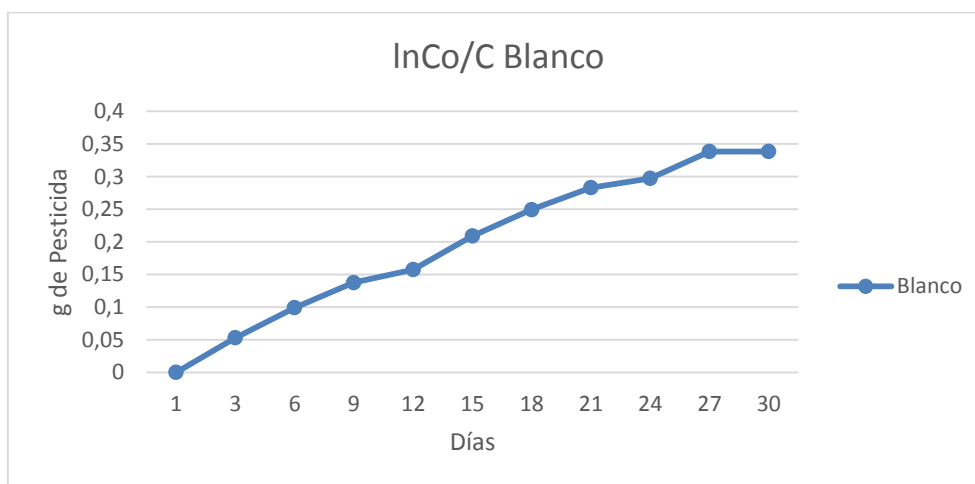


Figura 12. Resultados tasa de degradación de las bacterias del blanco, sin Humato 7+.

Al analizar los resultados de la tasa de degradación que muestra el blanco en comparación con los resultados de las especies *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis* en conjunto con las dos concentraciones de humato 7+ se puede evidenciar que los valores más altos de degradación de pesticida corresponden a *Bacillus thuringiensis* con una concentración de humato al 0.5%, la misma que presenta una degradación de 3.5 g de pesticida mientras que el blanco no sobrepasa los 0.35 g de degradación de pesticida. Por ende queda demostrado que el humato 7+ influye sobre la tasa de degradación del pesticida especialmente a una concentración de 0.5%.

Dichos resultados también se deben a que la especie *Bacillus thuringiensis* según (Carreras, 2011) produce quitinasas las cuales son empleadas para el control de hongos fitopatógenos, ya que atacan su pared celular y por tanto

inhiben su crecimiento, por ende esta bacteria ataca de la misma bacteria a los componentes del pesticida, convirtiéndola en una bacteria con una alta capacidad degradadora de pesticidas.

Distintos tipos de *Bacillus* son capaces de degradar pesticidas organofosforados como nos muestra (de Jesús Jiménez Torres , 2014) quien indica que el *Bacillus cereus* fue capaz de remover un 49.31% de este tipo de pesticidas, en un tiempo de 7 días en condiciones aerobias y de limitación de energía.

Según (Betancur , 2013) en el tratamiento realizado por bioestímulo con adición de pesticida predominaron las bacterias identificadas como *Bacillus thuringiensis*, *Flavobacterium sp.*, *Variovorax soli*, *Lysobacter sp*, durante las ocho semanas de tratamiento. También la especie *Bacillus thuringiensis* predominó en el tratamiento por atenuación natural, por lo que algunos investigadores han demostrado la habilidad de *Bacillus thuringiensis* para producir toxinas con potencial insecticida con la habilidad de degradar pesticidas como glifosato. En este estudio se pudo identificar que la especie *Bacillus thuringiensis* presentó los mejores resultados de eficiencia con un 79.6 % con la concentración 0.01% de humato y 84.79% con la concentración 0.5% de humato para degradar pesticidas organofosforados como es el Diazol 600 EC.

4.4.4. Tiempo de vida media

Tabla 20.

Tiempo de vida media del Diazol 600 EC frente a Bacillus megaterium.

Concentración	<i>Bacillus megaterium</i>	Unidad
0,01	18,075297	días
0,5	12,52381	días
SH	59,79685	días

Se puede evidenciar en estos resultados que el pesticida tiene un tiempo de vida media de 12 días cuando se lo expone a la bacteria *Bacillus megaterium* en conjunto con la concentración de humato 0.5%, mientras que al exponer el pesticida al testigo que no contiene humato, este presenta un tiempo de vida media de 59 días, lo que indica que el humato influye para que el tiempo de vida media del pesticida Diazol 600 EC sea menor.

Tabla 21.

Tiempo de vida media del Diazol 600 EC frente a Bacillus thuringiensis.

Concentración	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Unidad
0,01	13,449716	días
0,5	5,6861951	días
SH	52,904203	días

Claramente se puede evidenciar en estos resultados que el pesticida tiene un tiempo de vida media mucho menor cuando se enfrenta al *Bacillus thuringiensis* con la concentración de humato al 0.5%, lo que nos indica que el humato es una gran fuente de nutrientes para esta especie ya que disminuye el tiempo de vida media del pesticida que la especie *Bacillus megaterium*, ya que en este caso el pesticida tiene una vida media de 5 días lo cual demuestra que esta bacteria es más eficiente para degradar pesticidas organofosforados, a su vez al exponer el pesticida al testigo, este muestra un tiempo de vida media mayor de 52 días, lo que confirma que el humato 7+ influye en la degradación de pesticida.

Tabla 22.

Tiempo de vida media del Diazol 600 EC frente al Blanco.

Concentración	Blanco	Unidad
BL	55.3137261	días

Se evidencia que el pesticida tiene un tiempo de vida media mayor cuando se enfrenta al blanco, lo que indica que el humato si es necesario para reducir los tiempos de vida media de pesticidas organofosforados.

4.4.5. Eficiencia de la especie para degradar el pesticida

Tabla 23.

Valores de eficiencia en porcentaje de Bacillus megaterium y Bacillus thuringiensis para Diazol 600 EC.

Concentración	Eficiencia		
	0,01%	0,50%	Sin Humato
<i>Bacillus megaterium</i>	66,62%	80,97%	30,63%
<i>Bacillus thuringiensis</i>	79,36%	97,02%	33,77%
Blanco	61,3%		

Se puede observar que la bacteria *Bacillus thuringiensis* tiene una eficiencia mayor (97.02%) de degradación frente a la especie *Bacillus megaterium* (80.97%), lo cual nos da a conocer que es una bacteria muy capaz de degradar pesticidas organofosforados cuando se la adiciona humato 7+ con la

concentración 0.5%. También se puede observar que el blanco y las especies sin humato 7+ tienen una eficiencia menor que las que poseen concentraciones de humato.

4.5. Análisis estadístico

Para confirmar la confiabilidad de los resultados obtenidos, se realizó un análisis de normalidad obteniendo como resultado que el error es de 0.0001, es decir 99% de confiabilidad lo que demuestra que las especies y los tratamientos realizados dan un mismo resultado final confiable.

Tabla 24.

Prueba de normalidad (Shapiro.Wilks).

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral)
Degradación	15	0,18	0,24	0,57	< 0,0001

El análisis realizado detalla que los datos del crecimiento microbiano, parámetro indispensable para la degradación de pesticida organofosforado Diazol 600 EC, son normales lo que demuestra que los resultados obtenidos son confiables y la investigación es correcta.

Tabla 25.

Análisis de la varianza.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,44	8	0,05	0,82	0,6136
Tratamiento	0,44	6	0,07	1,09	0,4584
Especie	0	0	0	sd	sd
Concentración	1,30E-04	2	6,6e-	1,00E-03	0,999

			0,5
Error	0,4	6	0,07
Total	0,83	14	

Nota: Análisis de la Varianza (SC tipo I).

Tabla 26.

Significancia de las variables (Test de Tukey)

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
5	0,56	2	0,18	A
4	0,32	2	0,18	A
1	0,12	2	0,18	A
2	0,11	2	0,18	A
0	0,07	2	0,18	A
3	0,06	2	0,18	A
6	0,05	2	0,18	A

Nota: Alfa= 0.05 DMS=1.04858 Error: 0.0664 gl:6

Según demuestran los resultados obtenidos de significancia mediante las pruebas de Tukey, los tratamientos del ensayo de degradación de pesticida no tienen diferencias significativas, lo que quiere decir que estadísticamente los tratamientos realizados con las dos concentraciones de humato (0.01% y 0.5%), el testigo y el blanco generan resultados similares, ya que el valor de $p > 0.05$ se rechaza la hipótesis nula: La tasa de degradación de pesticidas organofosforados varía en relación a las concentraciones de humato 7+ utilizado. Por lo que se acepta la hipótesis alternativa: La tasa de degradación de pesticidas organofosforados no varía en relación a las concentraciones de humato 7+ utilizado. De acuerdo con estos resultados estadísticos se entiende que el pesticida será degradado sin importar las concentraciones de humato 7+.

Tabla 27.

Significancia de las variables (Test de Tukey)

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
2	0,31	6	0,11	A
1	0,1	6	0,11	A
0	0,07	3	0,15	A

Según demuestran los resultados obtenidos de significancia mediante las pruebas de Tukey, las especies involucradas en el ensayo de degradación de pesticida no tienen diferencias significativas, lo que quiere decir que estadísticamente las especies utilizadas (*Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*), generan resultados similares, ya que el valor de $p > 0.05$ se rechaza la hipótesis nula: La tasa de degradación de pesticidas organofosforados varía en relación a las especies microbianas empleadas. Por lo que se acepta la hipótesis alternativa: La tasa de degradación de pesticidas organofosforados no varía en relación a las especies microbianas empleadas. De acuerdo con estos resultados estadísticos se entiende que el pesticida será degradado sin importar la especie utilizada.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

A partir de la dilución de suelo del sector florícola se obtuvieron 12 especies de las cuales seis fueron positivas para la degradación de pesticidas organofosforados, de estas seis se identificó a la especie *Bacillus Thuringensis* y *Bacillus megaterium*, las cuales mostraron un mayor porcentaje de eficiencia para degradar Diazol 600 EC.

Estadísticamente las dos bacterias tienen una alta tasa de degradabilidad del pesticida, sin embargo, en la cinética microbiana se puede identificar que la especie *Bacillus thuringiensis* es más eficiente que la especie *Bacillus megaterium* para la degradación de DIAZOL 600EC.

Las pruebas de degradación muestran que la especie *Bacillus Thuringensis* es la especie con mayor eficiencia de degradación del pesticida, con una eficiencia del 70.05% mayor a la eficiencia que mostró la especie *Bacillus megaterium* con el 59.4%.

El humato 7+ influye significativamente sobre la degradación microbiana de pesticidas, ya que en el ensayo experimental el testigo y el blanco que no poseen humato muestran una tasa de degradación mucho menor que las concentraciones que contienen humato.

5.2. Recomendaciones

Implementar un análisis de cromatografía de gases para obtener resultados más concretos de la degradación del pesticida, así no será necesario realizar cálculos para transformar valores de biomasa celular a concentración de pesticida.

Se recomienda utilizar los humatos, ya que demostraron ser una gran fuente de nutrientes para los microorganismos degradadores de pesticidas y aumentará la eficiencia sobre el resultado esperado.

Realizar la caracterización del suelo para someter a las bacterias a factores reales como: pH, conductividad, humedad y temperatura y así obtener resultados más específicos.

Realizar análisis de degradación con concentraciones más altas de humato con la finalidad de degradar con más eficiencia el pesticida.

Para futuros proyectos de degradación de pesticidas se recomienda estudiar a profundidad la bacteria *Bacillus thuringiensis*, ya que demuestra tener una alta capacidad degradadora.

Referencias

- Betancur , B. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con el pesticida 1,1,1- tricloro-2,2'bis(p-clorofenil)etano (ddt) mediante protocolos de bioestimulación y adición de surfactante. Recuperado el 27 de septiembre de 2018 de <http://bdigital.unal.edu.co/9164/1/1088253581.2013.pdf>
- Guzman, A., Paz, C., y Gualoto , M. (2012). Comparación del rendimiento y engorde de la sal de humato vs un antibiótico promotor de crecimiento. (1.ª ed.). Ecuador.
- Kalantary, R., Shahamat, Y., Farzadkia, M., Esrafil, A., y Asgharnia, H. (2014). *Photocatalytic degradation and mineralization of diazinon in aqueous solution using nano-TiO₂(Degussa, P25): kinetic and statistical analysis of Desalination and Water Treatment*. Recuperado el 18 de septiembre de 2018 de <https://core.ac.uk/download/pdf/80049982.pdf>
- Rodríguez, G.(2007). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche crudaqueso paipa elaborado en los municipios de pacho (cundinamarca) y belen (boyaca). Recuperado el 10 de agosto de 2018 de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6749/13992026.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Santos W., y Castro, D. (2012). “Estudio de la pérdida del recurso suelo. pontificia universidad católica del ecuador. Recuperado el 28 de febrero de 2018 de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7094/6.H07.001317.pdf;sequence=4>
- Acción Ecológica. (2000). La industria de las flores. Recuperado el 05 de octubre de 2018 de <http://edualter.org/material/sobirania/enlace6.pdf>

- Adama. (2016). DIAZOL. Recuperado el 09 de noviembre de 2018 de <https://www.adama.com/ecuador/es/crop-protection/insecticide/diazol.html>
- Albert, M. (2013). Efectos fisiológicos de las sustancias húmicas sobre los mecanismos de toma de hierro en plántulas de tomate. Recuperado el 05 de diciembre de 2018 de https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/13432/1/tesis_oliver.pdf
- Amer., A., & Aly , E. (15 de 10 de 2010). *Division of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Taif, P.O. Box 888, Taif, Saudi Arabia in Biodegradation of Diazinon by Serratia marcescens DI101 and its Use in Bioremediation of Contaminated Environment*. Recuperado el 25 de julio de 2018 de <https://pdfs.semanticscholar.org/bcac/48a3fc63c78e377e29a89630e6244bddd992.pdf>
- American Chemical Society. (1996). *Humic and Fulvic Acids Isolation, Structure and Enviromental Role*. (J. Gaffney, N. Marley, & Clark Sue, Editores) Recuperado el 13 de noviembre de 2018
- Badii, M., y Varela. (2008). Toxicología de insecticidas. Recuperado el 08 de octubre de 2018 de <file:///C:/Users/HOME/Downloads/Dialnet-InsecticidasOrganofosforados-2881125.pdf>
- Bartual, J., y Berenguer, M. (1986). Pesticidas: clasificación y riesgos principales. Recuperado el 3 de septiembre de 2018 de http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101a200/ntp_143.pdf
- Bedmar, F. (2011). *Informe especial sobre plaguicidas agricolas*. Recuperado el 7 de septiembre de 2018 de <http://www.cienciahoy.org.ar/ch/In/hoy122/Plaguicidas%20-%20Bedmar.pdf>

- Benitez, P., Sanchez, A., Balza, A., Yuri Molina, y Molina, Y. (2015). Residuos de plaguicidas en fresa. Recuperado el 05 de septiembre de 2018 de <https://www.redalyc.org/pdf/857/85742727007.pdf>
- Burlakovs, J., Klavins, M., Osinska, L., y Purmalis, O. (2013). *The Impact of Humic Substances as Remediation Agents to the Speciation Forms of Metals in Soil*. Recuperado el 13 de marzo de 2018 de <file:///F:/Humatos/Impacto%20de%20ácidos%20húmicos%20en%20el%20tratamiento%20de%20metales%20pesados.pdf>
- Carreras, B. (2011). Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus Thuringiensis* en el control de fitopatógenos. Recuperado el 05 de noviembre de 2018 de <https://www.redalyc.org/html/4499/449945031006/>
- Castrejón, M., Sanchez, E., y Ortiz, L. (2014). Plaguicidas: Generalidades, usos e impactos sobre el ambiente y la salud. Recuperado el 10 de octubre de 2018 de https://www.researchgate.net/publication/307633848_PLAGUICIDAS_GENERALIDADES_USOS_E_IMPACTOS_SOBRE_EL_AMBIENTE_Y_LA_SALUD
- Corporación Financiera Nacional. (2017). Ficha sectorial: Cultivo de flores. Recuperado el 05 de octubre de 2018 de <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/2017/10/FS-Cultivo-de-Flores-octubre-2017.pdf>
- Curillo, S. (2015). Análisis de residuos de plaguicidas químicos en alimentos de consumo humano con la metodología de laboratorio ELISA. Recuperado el 11 de octubre de 2018 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4847/1/121482.pdf>
- Jiménez, A. (2014). Degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión por cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola. Recuperado el 29 de octubre de 2018 de

https://www.uv.mx/pozarica/mca/files/2012/10/Tesis_AnaCatya-de-Jesus-JimenezTorres-1-1.pdf

Deshmukh, A., Khobragade, R., y Dixit, P. (2007). *Biofertilizers and Biopesticides*. Oxford book company.

Expoflores. (2018). Recuperado el 02 de diciembre de 2018 de <http://flor.ebizaro.com/como-van-las-exportaciones-de-flores-de-ecuador/>

FAO. (2105). Erosión y pérdida de fertilidad del suelo. Recuperado el 06 de noviembre de 2018 de <http://www.fao.org/3/a-i5126s.pdf>

Fernandez, D., Mancipe , L., y Fernandez, D. (2010). INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS. Recuperado el 11 de octubre de 2018 de <http://www.scielo.org.co/pdf/med/v18n1/v18n1a09.pdf>

Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. Recuperado el 05 de octubre de 2018 de <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v26s1/nueve.pdf>

Garrity, G., Bell, J., y Lilburn, T. (2004). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Recuperado el 16 de diciembre de 2018 de <http://taxonomicoutline.org/content/7/7/1/pdf>

Guanga, O. (2018). Vulneración de derecho a la salud y a un ambiente sano de los habitates de Chical Maldonado por el uso exesivo de pesticidas. Recuperado el 09 de diciembre de 2018 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15295/1/T-UCE-013-AB-278-2018.pdf>

Guerra, S., & Reinoso, G. (2016). *Evaluación invitro de la capacidad bacteriana para remover plomo en aguas residuales domésticas*. Recuperado el 03 de noviembre de 2018 de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13062/1/UPS%20-%20ST002226.pdf>

Hidalgo, J. (2017). La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola. Recuperado el 03 de noviembre de 2018 de <http://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/6095/1/T2562-MRI-Hidalgo-La%20situacion.pdf>

Hidalgo, L. (2017). La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola. Recuperado el 09 de noviembre de 2018 de <http://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/6095/1/T2562-MRI-Hidalgo-La%20situacion.pdf>

Karr, M. (2015). *Using Humic Substances in the Bioremediation of Petroleum Polluted Soils*. ARCPACs Certified Professional Soil Scientist. Recuperado el 05 de noviembre de 2018 de <https://pdfs.semanticscholar.org/95b2/7468a47d6d6b89b80f8ee4db995eb31192da.pdf>

Kochany, J., y Smith, W. (2001). *Application of humic substances in environmental remediation*. Recuperado el 12 de noviembre de 2018 de http://www.academia.edu/25458521/Application_of_humic_substances_in_environmental_remediation

Ledesma, M. (2015). Evaluación de la eficiencia de extractos vegetales y agentes microbiológicos para el control del barrenador del fruto de la naranjilla neoleucinodes elegantalis. Rio negro, Tungurahua. Recuperado el 05 de noviembre de 2018 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4685/1/T-UCE-0004-19.pdf>

Levinsky, B. (09 de 1998). *Unlocking the power of humates*. Recuperado el 02 de diciembre de 2018 de http://www.lawrieco.com.au/uploaded_files/document_uploads/Ref%203.1.6%20%20Teravita%20Humate%20Article%20%20BV%20Levinsky%2

02002%20Russia.pdf.

López, G. T. (2016). Proyecto de investigación presentado como requisito previo a la obtención del Título de Licenciada en Laboratorio Clínico e Histotecnológico. Recuperado el 04 de noviembre de 2018 de <https://docplayer.es/92403326-Proyecto-de-investigacion-presentado-como-requisito-previo-a-la-obtencion-del-titulo-de-licenciada-en-laboratorio-clinico-e-histotecnologico.html>

López, M. (2014). Evaluación de la capacidad degradadora y acción de biorremediación de bacterias presentes en suelos con residuos de pesticidas de la florícola pencaflor. Recuperado el 10 de diciembre de 2018 de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/2272>

Lyons, G., & Genc, Y. (2016). *Commercial Humates in Agriculture: Real Substance or smoke and mirrors*. Recuperado el 10 de diciembre de 2018 de <https://www.mdpi.com/2073-4395/6/4/50>

Mathews, G. (2006). *Pesticides Health, Safety and the environment*. Recuperado el 11 de diciembre de 2018 de https://www.academia.edu/14506104/Pesticides_Health_Safety_and_the_Environment

Mlato, S., Blanco, J., Estrada, C., y Bandala, E. (2012). Degradación de pesticidas. Recuperado el 12 de octubre de 2018 de <http://estrucplan.com.ar/producciones/contenido-tecnico/p-efluentes-liquidados-y-gaseosos/degradacion-de-plaguicidas/>

Naranjo, A. (2017). La otra Guerra la situación de los plaguicidas en el Ecuador. Recuperado el 11 de diciembre de 2018 de <http://www.accionecologica.org/soberania-alimentaria/transgenicos/documentos/2242-2017-12-02-17-54-20>

Noni, G. D., & Trujillo, G. (2005). Degradación del suelo en el Ecuador Principales causas y algunas reflexiones. Recuperado el 04 de

noviembre de 2018 de
<https://outlook.live.com/mail/inbox/id/AQMkADAwATY0MDABLWQxNjYALTBIMjYtMDACLTAwCgBGAAADFS2rprNZDkSTwd0E9ImjGAcA%2FWG7Wj8f8UWEgVhLNywxUQAAAgEMAAAA%2FWG7Wj8f8UWEgVhLNywxUQAC%2B6U3pgAAAA%3D%3D/sxs/AQMkADAwATY0MDABLWQxNjYALTBIMjYtMDACLTAwCgBGAAADFS2rprNZDkSTw>

Obiols, J. (1999). Plaguicidas organofosforados (II): toxicodinamia y control biológico. Recuperado el 11 de noviembre de 2018 de http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_513.pdf

Pettit, R. (01 de 2012). La importancia del Ácido Húmico y Fúlvico en la fertilidad del suelo y plantas saludables. Recuperado el 22 de noviembre de 2018 de <https://static1.squarespace.com/static/55c8cff5e4b0af53827c3795/t/57236abad210b805ad7ed12f/1461938875597/2016.04.07+The+importance+of+Humic+and+Fulvic+acids+to+fertile+soils+and+healthy+plants-ESP.pdf>

Puerto, A. D., Suarez, S., y Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Recuperado el 24 de noviembre de 2018 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010

Quintero, J. (2011). Revisión: degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. Recuperado el 5 de octubre de 2018, de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/26394/37123>

Ramírez, J. A., y Lacasaña, M. (2001). Plaguicida, clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Recuperado el 12 de diciembre de 2018 de <https://www.invima.gov.co/images/pdf/intranet/Dir%20operaciones/revie>

w%20plaguicidas.pdf

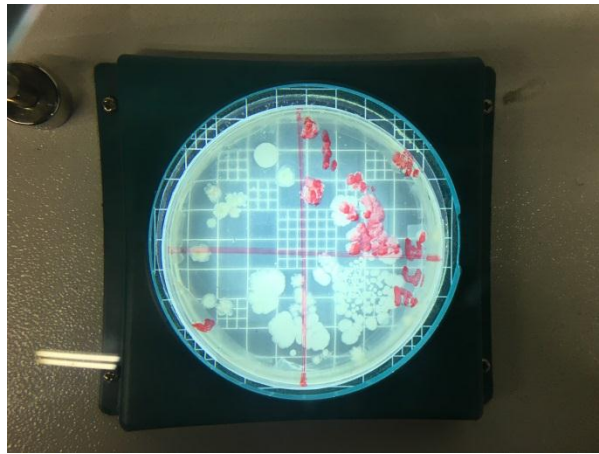
Rathore, H., & Nollet, L. (2012). *Pesticides evaluation of environmental pollution*. Recuperado el 12 de diciembre de 2018 de <https://www.crcpress.com/Pesticides-Evaluation-of-Environmental-Pollution/Rathore-Nollet/p/book/9781439836248>

Rodriguez, G. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda queso paipa elaborado en los municipios de pacho. Obtenido de UNIVERSIDAD DE la salle facultad de zootecnia bogotá. Recuperado el 15 de diciembre de 2018 de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6749/13992026.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

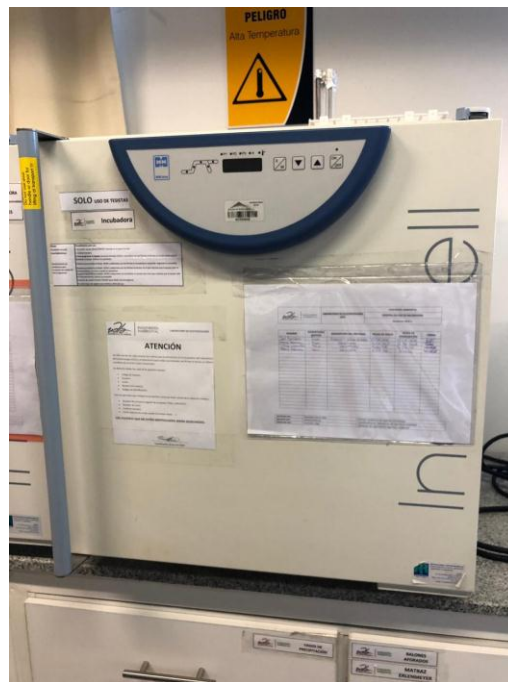
Sarrade, N., y Yanez, Y. (2017). Evaluación del efecto de los organofosforados y carbamatos en el suelo de la parroquia rural Puerto Limon, Snto Domingo. Recuperado el 30 de noviembre de 2018 de <file:///C:/Users/HOME/Downloads/UDLA-EC-TIAM-2017-26.pdf>

Sosa, A., Pazos, V., Torres, D., y Casadesús, L. (2011). Identificación y Caracterización de 6 aislados pertenecientes al género *Bacillus*. Recuperado el 01 de diciembre de 2018 de <http://scielo.sld.cu/pdf/fit/v15n1/fit06111.pdf>

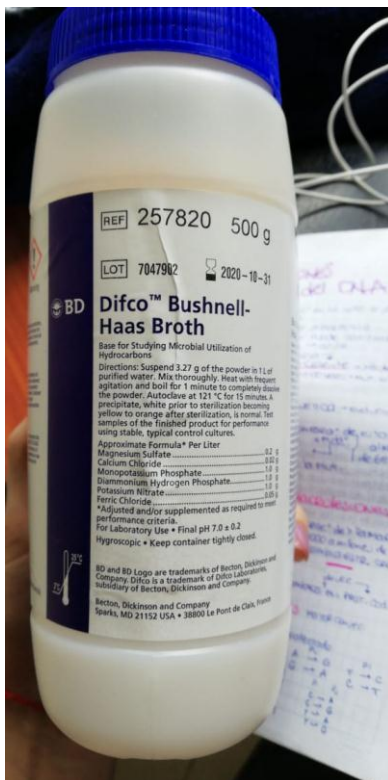
ANEXOS



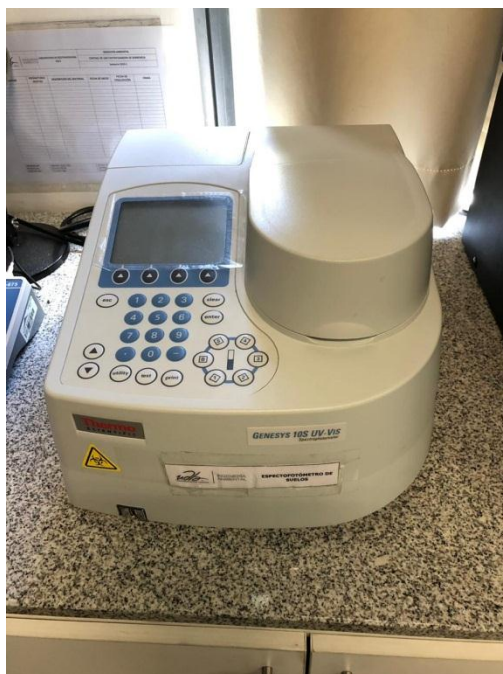
Anexo 1. Conteo microbiano por método de cuarteo.



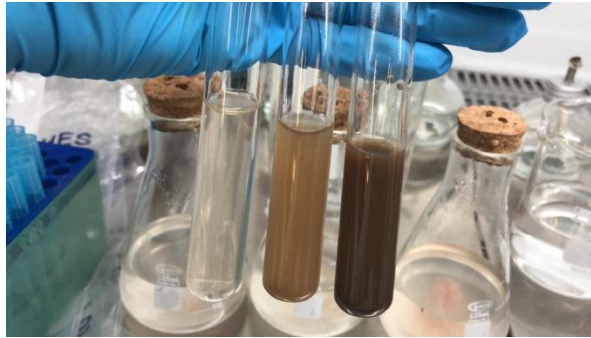
Anexo 2. Incubadora utilizada para los ensayos de degradación.



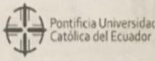

Anexo 3. Medio mineral utilizado en los ensayos de degradación.



Anexo 4. Espectrofotómetro de suelos utilizado para medir absorbancia de las unidades experimentales.



Anexo 5. Diluciones (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1})

Av. 12 de Octubre y Patria
 E-MAIL: diserlab@puce.edu.ec
 RUC: 179010601061
 Telef: 2991727
 Fax: 2991726
 Quito - Ecuador

RESULTADOS DE LA MUESTRA N°: MAG-67-2018

1.- IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: A1

Taxonomía	A1
Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilo
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>megaterium</i>

No.	Pruebas bioquímicas	A1
1	Coloración Gram	Gram positivos
2	Agar Sangre	C
3	Agar Mueller Hinton	C
4	Catalasa	+
5	Oxidasa	-
6	Motilidad	+
7	Simons citrato	+
8	Ureasa	-
9	Fermentación de la Glucosa	+
10	Fermentación de la Lactosa	+
11	D-Xilosa	+
12	D-Mannitol	+
13	Indol	-
14	Lisina descarboxilasa	-
15	Ornitina descarboxilasa	-
16	Producción de H ₂ S	-
17	Producción de gas	-
18	Rojo de metilo	-
19	Voges proskauer	-
20	Reducción del Nitrito	-
21	Crecimiento en NaCl al 7%	C
22	Hidrólisis del almidón	+
23	Hidrólisis de la caseína	+
24	Hidrólisis de la gelatina	+
	Resultado	A1
	Género y especie	<i>Bacillus megaterium</i>
	Metodología	Pruebas bioquímicas

C : Crecimiento; NC: No hay crecimiento

Página 2 de 4

Anexo 6. Resultados de la identificación bioquímica de la especie *Bacillus megaterium*.

2.- IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: B1

Taxonomía	B1
Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>thuringensis</i>

No.	Pruebas bioquímicas	B1
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%	+
	Resultado	B1
	Género y especie	<i>Bacillus thuringensis</i>
	Metodología	Pruebas bioquímicas

C: Crecimiento; NC: No hay crecimiento

3.- IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: C1

Se aislan dos bacterias:

Bacillus megatherium C1 (1)

Bacillus thuringensis C1 (2)

Resultado	C1(1)
Género y especie	<i>Bacillus megatherium</i>
Metodología	Pruebas bioquímicas

Anexo 7. Resultados de la identificación bioquímica de la especie *Bacillus thuringiensis*.

