



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS Y BACTERIAS PROCEDENTES DE UN SUELO AGRÍCOLA CONTAMINADO CON PLAGUICIDAS DE LA PARROQUIA SAN LUIS PARA LA ELECCIÓN DEL MICROORGANISMO MÁS EFICIENTE PARA SU BIORREMEDIACIÓN.

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACION

Presentado para optar el título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: JIKSON RAFAEL RUIZ CASTRO
TUTOR: ING. JUAN CARLOS GONZÁLEZ GARCÍA

Riobamba - Ecuador

2018

©2018, Jikson Rafael Ruiz Castro

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS Y BACTERIAS PROCEDENTES DE UN SUELO AGRÍCOLA CONTAMINADO CON PLAGUICIDAS DE LA PARROQUIA SAN LUIS PARA LA ELECCIÓN DEL MICROORGANISMO MÁS EFICIENTE PARA SU BIORREMEDIACIÓN**, de responsabilidad del señor Egresado: Jikson Rafael Ruiz, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
ING. JUAN CARLOS GONZÁLEZ GARCÍA DIRECTOR TRABAJO TITULACIÓN
ING. CRISTINA GABRIELA CALDERON TAPIA MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Jikson Rafael Ruiz Castro, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 01 de Marzo del 2018

Jikson Rafael Ruiz Castro

C.I. 080270335-5

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, a mi padre Víctor Ruiz por brindarme su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos por las ganas que siempre me dio para seguir adelante, a mi madre Victoria Castro por brindarme su comprensión y cariño que desde lejos fue una de las tantas razones que me ayudaban a continuar cada día sin pensar en rendirme.

A mis hermanos por representar la unidad familiar, estar siempre a mi lado apoyándome en los buenos y malos momentos de mi vida.

A mis tíos/as y abuelos ya que este trabajo al igual que a mi representa mucho para ellos por lo que siempre me han brindado su apoyo emocional y moral el cual sirvió como pieza fundamental para la culminación exitosa de mi carrera.

AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirme y acompañarme a lo largo de mi vida, por fortalecerme en los momentos de debilidad, por brindar fuerzas a mis padres y darles la posibilidad de apoyarme económicamente para la culminación de la carrera.

En especial al Ing. Juan Carlos González García director del Trabajo de Titulación, a la Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia Miembro del Trabajo de Titulación, colaboradores del Proyecto de Titulación, quienes con sus conocimientos se encargaron de guiarme en el desarrollo de mi Proyecto.

Con gratitud a la Ing. Ana María Cunachi Pillajo M. Sc. Quien, mostrando dotes de buen corazón, que sin conocerme accedió a guiarme para la elaboración paso a paso y con mucha paciencia de la parte experimental de mi trabajo a cambio de nada, cuyos conocimientos me fueron de mucha utilidad para el desarrollo del mismo.

Con infinita gratitud a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, especialmente a la Carrera de Ing. Biotecnología Ambiental, donde recibí los conocimientos que me permitirán realizarme como profesional. A nuestros profesores y amigos de la carrera de Ing. En Biotecnología Ambiental, con quienes he compartido una etapa muy importante en mi vida.

También agradezco a mi familia que ha sido un pilar de apoyo para iniciar y culminar con éxito este proyecto.

TABLA DECONTENIDO

RESUMEN.....	XV
SUMMARY	XVI
INTRODUCCIÓN	1
FÓRMULACION DEL PROBLEMA	2
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVOS.....	7
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	6
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	8
1.1 Suelo.....	7
1.1.1 <i>Características del suelo</i>	7
1.1.2 <i>Usos del suelo</i>	14
1.2 Agroquímicos.....	13
1.2.1 <i>Plaguicidas</i>	14
1.3 Fuentes de contaminación	18
1.3.1 <i>Fuentes puntuales</i>	18
1.3.2 <i>Fuentes no puntuales</i>	18
1.4 Áreas sensibles.....	19
1.5 Movimiento de los pesticidas.....	19
1.5.1 <i>Contaminación del aire</i>	20
1.5.2 <i>Contaminación del agua</i>	21
1.5.3 <i>Contaminación del suelo</i>	22
1.6 Biorremediación de suelos contaminados	23

1.6.1	<i>Biomagnificación</i>	23
1.6.2	<i>Bioacumulación</i>	23
1.6.3	<i>Biocontrol</i>	24
CAPÍTULO II		
2	MARCO METODOLÓGICO	25
2.1	Diseño experimental	25
2.1.1	<i>Tipo y diseño de investigación</i>	25
2.1.2	<i>Unidad de análisis</i>	25
2.1.3	<i>Población de estudio</i>	26
2.1.4	<i>Tamaño de muestra</i>	26
2.1.5	<i>Selección de muestra</i>	26
2.2	METODOLOGÍA	27
2.2.1	<i>Localización de la experimentación</i>	27
2.2.2	<i>Lugar del muestreo</i>	27
2.2.3	<i>Caracterización básica de las muestras de suelo</i>	27
2.2.4	<i>Aislamiento y purificación de microorganismos</i>	28
2.2.5	<i>Almacenamiento y conservación de los cultivos obtenidos</i>	29
2.2.6	<i>Identificación de microorganismos basada en pruebas bioquímicas</i>	29
2.2.7	<i>Influencia de pesticidas en la morfología de colonia de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de suelo del sitio en estudio</i>	31
2.2.8	<i>Diseño estadístico</i>	32
CAPÍTULO III		
3	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
3.1	Localización de la experimentación	33
3.2	Lugar del muestreo	33
3.3	Caracterización preliminar de las muestras de suelo	34
3.4	Aislamiento y purificación de microorganismos	35
3.5	Almacenamiento y conservación de los cultivos obtenidos	36

3.6	Identificación de microorganismos basada en Pruebas bioquímicas	36
3.6.1	<i>Prueba de Oxido/Fermentación.....</i>	36
3.6.2	<i>Prueba de Utilización de Citrato.....</i>	38
3.6.3	<i>Prueba enzimática en relación al oxígeno: Catalasa.....</i>	38
3.6.4	<i>Prueba de la actividad amilolítica (hidrolisis del almidón)</i>	40
3.6.5	<i>Actividad lignocelulolítica.....</i>	40
3.6.6	<i>Degradación de la Caseína</i>	42
3.6.7	<i>Determinación del crecimiento microbiano bajo la influencia directa de pesticidas .</i>	43
3.7	Análisis de resultados de la actividad enzimática cualitativa (\emptyset = mm de halos de hidrólisis).....	44
3.8	Análisis de la influencia de pesticidas en la morfología de colonia de los aislamientos obtenidos del sitio es estudio	46
	CONCLUSIONES.....	50
	RECOMENDACIONES.....	51
	BIBLIOGRAFIA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Funciones y síntomas de deficiencia de nutrientes en plantas.	10
Tabla 2-1 Insecticidas según su composición química	15
Tabla 3-1 Fungicidas según su composición química.....	15
Tabla 4-1 Herbicidas según su composición química.....	16
Tabla 5-3 Codificación y caracterización de las muestras de suelo.	34
Tabla 6-3 Test de Kruskal – Wallis para la Actividad enzimática (amilolítica, lignocelulolítica y degradación de caseína) de los 132 aislamientos microbianos.	45
Tabla 7-3 Tabla de Contingencia Rugby * control de los 132 aislamientos microbianos.	47
Tabla 8-3 Tabla de Contingencia Try+Sha*control de los 132 aislamientos microbianos.	48
Tabla 9-3 Tabla de Contingencia Rugby*Try+Sha de los 132 aislamientos microbianos.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-3 Ubicación geográfica del sitio en estudio.....	33
Figura 2-3 Aislamientos microbianos obtenidos de las muestras de suelo en estudio.....	35
Figura 3-3 Resultados de la Prueba de O/F de los 132 aislamientos microbianos.....	37
Figura 4-3 Resultados de la Prueba de Utilización de Citrato de los 132 aislamientos microbianos.	38
Figura 5-3 Resultados de la Prueba Enzimática en relación al oxígeno: Catalasa, de los 132 aislamientos microbianos.....	39
Figura 6-3 Resultados de la Prueba de actividad amilolítica de los 132 aislamientos microbianos.	40
Figura 7-3 Resultados de la Prueba de actividad lignocelulolítica de los 132 aislamientos microbianos.....	41
Figura 8-3 Resultados de la Prueba de Degradación de la Caseína de los 132 aislamientos microbianos.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A Medio de Hugh & Leifson.

ANEXO B Medio Citrato de Simmons

ANEXO C Medio de inducción Agar Almidón

ANEXO D Medio de inducción Agar CMC

ANEXO E Medio Agar leche descremada

ANEXO F Resultados de la Prueba de O/F de los 132 aislamientos microbianos.

ANEXO G Resultados de la Prueba de Utilización de Citrato de los 132 aislamientos microbianos.

ANEXO H Resultados de la Prueba Enzimática en relación al oxígeno: catalasa de los 132 aislamientos microbianos

ANEXO I Resultados de la Prueba de actividad amilolítica de los 132 aislamientos microbianos

ANEXO J Resultados de la Prueba de actividad lignocelulolítica de los 132 aislamientos microbianos

ANEXO K Resultados de la Prueba de Degradación de la Caseína de los 132 aislamientos microbianos

ANEXO L Resultados de la Prueba de Crecimiento Microbiano bajo la actividad de los insecticidas utilizados en los cultivos

ANEXO M Aislamientos de bacterias, hongos y actinomicetes aislados de las muestras de suelo del sitio en estudio.

ANEXO N Pruebas bioquímicas de identificación de microorganismos.

ANEXO O Actividad enzimática amilolítica: Hidrólisis de Almidón

ANEXO P Aislamientos de bacterias, hongos y actinomycetes bajo la influencia de Rugby, Tryclan + Sharfip y Control.

INDICE DE ABREVIATURAS

Ph	Potencial de hidrógeno
N, NH_4^+ , NO_3^-	Nitrógeno, Amonio, Nitrato
P, H_2PO_4^- , HPO_4^-	Fósforo, Iones fosfatos
K^+	Potasio
Ca^{2+}	Calcio
Mg^{2+}	Magnesio
Mn^{2+}	Manganeso
Zn^{2+}	Zinc
Fe^{2+}	Hierro
Cu^{2+}	Cobre
BO_3^-	Boro
MoO_4^-	Molibdeno
Cl^-	Cloro
PDA	Potatoe Dextrose agar
AN	Nutrient Agar
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
O/F	Oxido/Fermentación
CMC	Carboximetilcelulosa
NaCl	Cloruro de sodio
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
T3	Control
<i>P</i>	Probabilidad

X^2	Chi cuadrado
SF	Suelo frutilla
ST	Suelo tomate
DCB	Departamento de Ciencias Biológicas
+	Reacción positiva
-	Reacción negativa
Escala 0	sin reacción
Escala 1	reacción baja
Escala 2	reacción media
Escala 3	reacción abundante
Ø	Diámetro
Mm	milímetros
%	Porcentaje
T0	Sin crecimiento
T1	Alteración morfológica
T3	Morfología normal
\bar{X}	Media
Try+Sha	Tryclan + Sharfip

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la actividad enzimática de hongos y bacterias procedentes de un suelo agrícola contaminado con plaguicidas, de la parroquia San Luis, para la elección del microorganismo más eficiente para su biorremediación. Esta actividad enzimática fue evaluada en 132 aislamientos obtenidos de las muestras de suelo del sitio en estudio, mediante la comparación de la actividad amilolítica, lignocelulolítica y de degradación de caseína. Adicionalmente, se realizaron pruebas de identificación bioquímica para entender otros complejos enzimáticos que pudieran ser importantes. También, se probó la incidencia directa de los pesticidas (Rugby, Tryclan + Sharfip) frecuentemente usados en los ciclos agrícolas para ver su influencia directa en el crecimiento y morfología de la colonia y finalmente con estos resultados establecer el o los microorganismos eficientes con potencial para biorremediación. Los resultados mostraron que el 80% del total de los aislamientos fueron efectivos para la actividad amilolítica, el 50% evidenciaron actividad lignocelulolítica y tan solo el 25% fueron capaces de degradar caseína. El análisis estadístico entonces arrojó una diferencia altamente significativa para actividad enzimática con una $p < 0,05$. La influencia directa de los insecticidas en la morfología microbiana reveló que Rugby afecta al 99,2% de los aislamientos, mientras que la mezcla (Tryclan + Sharfip) no afectó al 61,4% de aislamientos, 33,3% fueron de alguna forma alterados en su morfología y sólo el 5,3% fue afectado. Bajo este contexto, el actinomicete DCB3025 y los hongos DCB 3007,3010, 3019, 3031 y 3043 fueron los más eficientes para el objetivo planteado en este trabajo, razón por la que se recomienda utilizarlos como potenciales biorremediadores en fuentes contaminadas con pesticidas u otros materiales utilizados en la producción agrícola.

PALABRAS CLAVE: <BIOTECNOLOGÍA>, <BIORREMEDIACIÓN>, <ACTIVIDAD ENZIMÁTICA>, <RESIDUALIDAD>, <TOXICIDAD>, <ACTIVIDAD BIOLÓGICA>, <MICROBIOTA DEL SUELO>, <DEGRADACIÓN>

SUMMARY

The objective was to evaluate the enzymatic activity of fungi and bacteria from an agricultural soil contaminated with pesticides, from the San Luis parish, for the choosing the most efficient microorganism for its bioremediation. This enzymatic activity was evaluated in 132 isolations obtained from the soil samples of the study site, by comparing the amylolytic, lignocellulolytic and casein degradation activity. Additionally, biochemical identification tests were performed to understand other enzymatic complexes that could be important. In addition, the direct incidence of pesticides (Rugby, Tryclan + Sharfip) frequently used in agricultural cycles was tested to see their direct influence on the growth and morphology of the colony and finally with these results to establish the efficient microorganism with potential for bioremediation. The results showed that 80% of the total isolates were effective for amylolytic activity, 50% showed lignocellulolytic activity and only 25% were able to degrade casein. The statistical analysis then showed a highly significant difference for enzymatic activity with $p < 0.05$. The direct influence of the insecticides on the microbial morpho-physiology revealed that Rugby affects 99.2% of the isolates, while the mixture (Tryclan + Sharfip) did not affect 61.4% of isolates, 33.3% were somehow altered in their morphology and only 5.3% was affected. Under this context, the actinomycete DCB3025 and fungi DCB 3007,3010, 3019, 3031 and 3043 were the most efficient for the objectives proposed in this work, this is why it is recommended to use them as potential bioremediators in sources contaminated with pesticides or other materials used in agricultural production.

KEY WORDS: <BIOTECHNOLOGY>, <BIOREEMEDIATION>, <ENZYMATIC ACTIVITY>, <RESIDUALITY>, <TOXICITY>, <BIOLOGICAL ACTIVITY>, <SOIL MICROBIOTE>, <DEGRADATION>

INTRODUCCIÓN

Situación Problemática

La parroquia San Luis del cantón Riobamba provincia de Chimborazo, tiene como actividad principal a la agricultura por la disponibilidad de agua y tierras fértiles, contribuyendo al desarrollo socio económico de la población, generando ingresos estables, a través de la producción agrícola. En la actualidad la mayoría de cultivos han sido tratados con agroquímicos ya sea para cuidarlos de plagas o para el mejoramiento de su producción, se conoce que cuando un plaguicida es liberado en el medio ambiente, en este caso el suelo, interacciona con los componentes bióticos y abióticos de éste, sufriendo transformaciones en su estructura, capaces de modificar profundamente sus características físico-químicas y su acción biológica. (Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial(PDYOT) SAN LUIS, 2015)

La agricultura afecta también a la base de su propio futuro a través de la degradación de la tierra, la salinización, el exceso de extracción de agua y la reducción de la diversidad genética agropecuaria. Sin embargo, las consecuencias a largo plazo de estos procesos son difíciles de cuantificar. (Gonzales, 2011)

Se han desencadenado una serie de problemas ambientales por el uso desmedido de agroquímicos, esto genera contaminación del suelo y en casos extremos ocasionando la contaminación de fuentes hídricas ya sean subterráneas por infiltración, o de fuentes superficiales por arrastre por las lluvias, lo que ha generado que con el paso del tiempo, todos estos suelos cultivados vayan perdiendo sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, generando así una degradación del mismo. La problemática más grave está ligada al abuso de los agroquímicos como es la pérdida de la biodiversidad microbiológica de los suelos, perdiéndose también la posibilidad de que los mismos sean remediados ya que la capacidad de regeneración se ve limitada. (Orta , 2002)

En la parroquia San Luis se encuentra el sector de “San Vicente de Tiazo”, el mismo que se caracteriza por su producción agrícola, se encuentra ubicado un terreno cuyos propietarios se han dedicado al cultivo de frutillas durante un lapso aproximado de cinco años, cosechando cada ocho meses con períodos de descanso y preparación del suelo de dos meses. En el período de preparación de suelo emplean el uso de Rugby que es un

nematicida que tiene como principio activo al Cadusafos, compuesto perteneciente a los organofosforados de fórmula química $C_{10}H_{23}O_2PS_2$, una vez durante el período de preparación. (Tuquinga, 2016)

En la fase de siembra emplean Tryclan que es un insecticida contra la Mosca Blanca, que tiene como principio activo al Tiociclam de fórmula química $C_5H_{11}NS_3$, perteneciente al grupo químico Nereistoxina, cada tres meses durante el período de cultivo y el Sharfip insecticida contra los Trips, insectos que atacan a la flor, que tiene como principio activo al Fipronil compuesto perteneciente a los organoclorados de fórmula química $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$, una vez cuando brotan las flores. (Tuquinga, 2016)

Por dichas razones es necesario plantearse la siguiente pregunta.

¿Podrá la actividad enzimática de Hongos y Bacterias de un suelo de cultivo ser implementada para la Biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas?

FÓRMULACION DEL PROBLEMA

Bajo el contexto actual de la agricultura intensiva, el uso indiscriminado de agroquímicos y el manejo de cultivo basado en plaguicidas, la degradación de suelos desde el punto de vista productivo, evidencia que la calidad de éstos se ve fuertemente afectada debido a que las poblaciones microbianas disminuyen o desaparecen, cuando no logran sobrevivir bajo condiciones degradadas a las que son expuestos por presencia de los residuos de los pesticidas. Sin duda, el mayor problema entonces ocurre cuando no hay presencia o equilibrio de poblaciones microbianas que son las responsables de la actividad biológica para transformar, degradar y permitir la asimilación de nutrientes por parte de las plantas, lo cual se ve reflejado en la fisiología inadecuada de los cultivos, así como en su producción.

También, la concentración de residuos de pesticidas incide y transforma las poblaciones microbianas ya que las hace susceptibles e ineficientes en su actividad metabólica impidiendo así su función biológica.

ANTECEDENTES

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

Torrez, (2003.) Señala que los compuestos tóxicos más usados son los plaguicidas, los cuales en muchos casos resultan ser muy tóxicos. Estos compuestos químicos constituyen una adecuada fuente de carbono y donadores de electrones para ciertos microorganismos del suelo. En la literatura existen algunos ejemplos de degradación de plaguicidas por microorganismos, entre los cuales se pueden citar los siguientes.

Según Aharonson *et al.* (1990.), las *Pseudomonas* son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. La capacidad de estas bacterias para degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica.

Algunas especies de hongos filamentosos incluyendo aquellas del género *Trichoderma*, pueden degradar diferentes fuentes de residuos celulósicos y lignocelulósicos. Con base en esta capacidad enzimática, las especies de *Trichoderma* pueden potencialmente contribuir en la degradación de compuestos orgánicos contaminantes depositados en el suelo. De manera específica, la forma en que un microorganismo interactúa con un contaminante de naturaleza orgánica, es diferente a la de un contaminante de origen inorgánico. Los microorganismos pueden transformar los contaminantes orgánicos en compuestos que presenten menor o mayor toxicidad, con respecto al compuesto original. En contraste, algunos microorganismos pueden degradar completamente los contaminantes orgánicos, lo que implica su completa mineralización hasta compuestos inocuos como agua y dióxido de carbono. (Alarcon *et al.*, 2009)

(Dominguez *et al.*, 2005) Evaluaron la degradación del insecticida clorpirifos en muestras de suelo durante 21 días, utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. En los ensayos se obtuvieron porcentajes de degradación, en promedio, para las muestras con hongo, de 96,3, 82,4 y 62,2% cuando se trabajaron, respectivamente, con concentraciones iniciales de clorpirifos de 0,95, 5,3 y 9,4 $\mu\text{g/g}$. Igualmente, los porcentajes de degradación estuvieron acompañados del aumento en la velocidad de degradación, cuando se partió de la concentración inicial de 0,95 $\mu\text{g/g}$.

JUSTIFICACIÓN

Al ser la parroquia rural San Luis uno de los principales abastecedores de productos agrícolas de la provincia de Chimborazo, y porque no decir de todo el país, los productores se ven obligados a satisfacer las necesidades de los consumidores para lo cual deben garantizar la buena calidad de sus productos por lo que se han visto en la obligación de emplear agroquímicos para garantizarlo. (PDYOT SAN LUIS, 2015)

Al dedicarse a la agricultura durante décadas, los suelos han venido perdiendo todas sus cualidades y propiedades, produciéndose así una degradación progresiva de los mismos teniendo como consecuencias pérdidas económicas por la baja producción de los cultivos, afectaciones a la salud, ya que se conoce la capacidad de ciertos compuestos químicos a su acumulación por su fuerte persistencia en el medio. (PDYOT SAN LUIS, 2015)

Las plagas son responsables de más del 40% de las pérdidas de la producción potencial de alimentos durante su producción y de un 20% tras las cosechas (Quintero, 2011), por lo que se podría decir que, “los plaguicidas químicos han proporcionado una mejora significativa en la producción agrícola, sin embargo, también han ejercido un importante efecto adverso en el ambiente debido a su toxicidad, bioacumulación y persistencia en suelo, agua y aire”. (Dua *et al.*, 2002). La aplicación de los plaguicidas y los residuos generados, su mal manejo y disposición incontrolada, son las principales causas de contaminación ambiental, principalmente del recurso suelo, debido a su elevada adsorción sobre la materia orgánica, su baja volatilidad y estabilidad química, que les confiere un bajo grado de movilidad y una elevada persistencia. A pesar de estas características, la volatilización y la disolución en cuerpos de agua son importantes mecanismos de dispersión de la contaminación. (Quintero, 2011).

La biorremediación es un tratamiento tecnológico de descontaminación que usa sistemas biológicos para catalizar la destrucción o transformación de componentes peligrosos en el ambiente. El empleo de plantas para la eliminación de contaminantes del suelo, se denomina comúnmente como fitorremediación mientras que el término biorremediación se ha limitado al empleo de microorganismos o sus enzimas. Existe un gran número de trabajos de investigación en laboratorio y en campo, orientados a la degradación de plaguicidas empleando bacterias. Este amplio uso se debe a que son fácilmente

cultivables y manipulables genéticamente, crecen rápidamente, y son capaces de usar los plaguicidas como fuente de nutrientes, aunque requieren de una previa adaptación al medio y a los contaminantes que van a degradar. (Quintero, 2011).

Se plantea evaluar la actividad enzimática que presentan microorganismos propios del suelo con la finalidad de implementarlos para poder recuperar estos suelos mediante una biorremediación de tal manera que se pueda beneficiar a todos los agricultores de la zona, mejorando la calidad del suelo y por ende la calidad de sus cultivos y porque no mejorar la calidad de vida, así como también se ayudara a la conservación de la microbiota presente en estos suelos cultivados.

A partir de la década de los 80, se incrementó el interés acerca de la posibilidad de implementar en procesos de biorremediación a hongos de la pudrición blanca de la madera. Al pertenecer estos a la clase *Basidiomicete* y por presentar una gran capacidad de degradación de la lignina presente en la madera. Uno de los primeros trabajos sobre el tema indica que estos hongos, pueden degradar una amplia variedad de contaminantes ambientales. Las principales ventajas de estos hongos son la tolerancia a concentraciones considerablemente altas de contaminantes y su capacidad para crecer a bajos valores de pH. Además, gracias a la extensión de sus hifas, puede alcanzar contaminantes en el suelo, que no son biodisponibles ni biodegradables para otros organismos, y dado que requieren de sustratos lignocelulósicos para su crecimiento, es posible adicionar a los sitios contaminados, residuos de muy bajo costo como viruta de madera, carozo de maíz o paja de trigo, para promover su crecimiento e incrementar la degradación de los contaminantes. (Quintero, 2011).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar de la actividad enzimática de hongos y bacterias procedentes de un suelo agrícola contaminado con plaguicidas de la parroquia San Luis para la elección del microorganismo más eficiente para su biorremediación.

Objetivos Específicos

- Comparar la actividad enzimática (Lignocelulosica y/o Amilolítica) de bacterias y hongos presentes en el suelo de cultivo.
- Comprobar la resistencia de bacterias y hongos presentes en un suelo de cultivo contra los insecticidas Rugby, Tryclan, y Sharfip.
- Establecer el ó los microorganismos más eficientes para la biorremediación del suelo.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Suelo

El suelo es un medio dinámico en el que interactúan procesos básicos, además, es el hábitat que soporta y sustenta a las plantas y a la multitud de organismos que conviven con ellas. (De la Rosa, 2008)

1.1.1 Características del suelo

1.1.1.1 Características físicas

La calidad de un suelo está limitada por sus características físicas que son:

1.1.1.1.1 Estructura

La estructura es la disposición en que se unen las diversas partículas del suelo para formar agregados y la unión de éstos entre sí. De la textura depende que las raíces del cultivo penetren adecuadamente en el suelo, que circule bien el aire y el agua, y que exista una abundante microbiota. (De la Rosa, 2008).

1.1.1.1.2 Textura

La textura del suelo se refiere a la distribución de los agregados y al tamaño de las partículas. La textura influye en el comportamiento del suelo respecto a la capacidad de retención de agua y nutrientes, su permeabilidad y capacidad para descomponer la materia orgánica. (Hudson Norman, 1982).

1.1.1.1.3 Temperatura

La temperatura es un factor que condiciona los procesos microbianos, influye en la absorción de los nutrientes especialmente del fósforo que es menor en suelos fríos. (Hudson Norman, 1982).

1.1.1.1.4 Color

El color del suelo puede orientar sobre los componentes del suelo. Los colores blancuzcos es por la presencia de caliza o yeso, mientras que los oscuros es por la presencia de materia orgánica y óxidos de hierro, los grises-verdosos denotan la falta de drenaje de agua, los pardos-rojos se supone es por la presencia de una adecuada permeabilidad. (Last *et al.*, 2013).

1.1.1.2 Propiedades químicas

1.1.1.2.1 Materia orgánica

La materia orgánica tiene su origen en organismos vivos, que al morir se han incorporado al suelo, principalmente restos de vegetales. La materia orgánica mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, favorece la respiración de las raíces y germinación de las semillas. (Buckman, 1996).

1.1.1.2.2 Potencial hidrógeno

El potencial de hidrógeno (pH) mide la actividad de los H⁺ libres en la solución del suelo y de los H⁺ fijados sobre el complejo de cambio. El pH puede variar y se clasifican en:

- **Suelos ácidos:** pH inferior a 6.5.
- **Suelos neutros:** pH entre 6.6 y 7.5.
- **Suelos básicos:** pH superior a 7.5. (Prasad Ragedra & Power James, 2008).

1.1.1.2.3 Fertilidad

La fertilidad del suelo se refiere principalmente a la cantidad y disposición de los nutrientes esenciales para las plantas, reacciones químicas que experimentan en suelo, mecanismos de la pérdida, procesos que los hacen no disponibles o menos disponibles para las plantas de cosecha, y maneras y medios de reponerlos. (Prasad Ragedra & Power James, 2008).

En la Tabla 1-1, se muestran las funciones importantes y los síntomas de la deficiencia de los nutrientes esenciales de la planta.

Tabla 1-1 Funciones y síntomas de deficiencia de nutrientes en plantas.

Nutrientes (formas de absorción)	Funciones en las plantas	Síntomas de deficiencia
Nutrientes primarios		
Nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^-)	Síntesis de aminoácidos, proteínas, clorofila, ácidos nucleicos, coenzimas	Hojas de color verde claro, las hojas inferiores se vuelven amarillas
Fósforo (H_2PO_4^- , HPO_4^-)	Transferencia metabólica procesos, ATP, ADP, fotosíntesis y respiración; componente de fosfolípidos	Hojas purpurinas, sobre todo en los márgenes
Potasio (K^+)	Involucrado en la formación de azúcar y almidón; lípidos metabolismo y fijación del nitrógeno; neutraliza los ácidos orgánicos	Quemado de hojas, rizado de hojas
Nutrientes secundarios		
Calcio (Ca^{2+})	Componente de las paredes celulares; crecimiento celular y división celular; cofactor para algunas enzimas	Fracaso en el desarrollo de la yema terminal, puntos muertos en la costilla media de algunas plantas. En el maíz, la punta de las hojas nuevas se puede cubrir con un material pegajoso, gelatinoso que hace que se adhieran entre sí

Magnesio (Mg^{2+})	Componente de la clorofila, por lo tanto es esencial para la síntesis de alimentos en la planta	Hojas verdes claras y amarillentas de hojas similares a N. Las hojas se ahuecan hacia adentro
Micro-nutrientes		
Manganeso (Mn^{2+})	Procesos de óxido-reducción, descarboxilación y reacciones de hidrólisis	Decoloración intervenida - vetas verdes contra un fondo pálido; blanqueamiento y abscisión de hojas.
Zinc (Zn^{2+})	Formación de auxinas y cloroplastos; metabolismo de carbohidratos; orientación estabilizadora y estructural de las proteínas de membrana	Crecimiento atrofiado, pálido a la coloración blanca de hojas jóvenes — yema blanca y vetas blancas en hojas de maíz; rojo pardusco (oxidado) decoloración de las hojas en el arroz conocido popularmente como "Khaira" enfermedad en arroz. El maíz, las habas, la fruta cítrica, y el arroz son plantas del indicador para la deficiencia del zinc
Hierro (Fe^{2+})	Componente estructural de los citocromos, pericromos, y por lo tanto involucrados en las reacciones de óxido-reducción en la respiración y la fotosíntesis	Coloración amarillenta o blanqueamiento de hojas jóvenes, clorosis intervenal amarillo pálido en el tallo
Cobre (Cu^{2+})	Componente de la clorofila, catalizador para la respiración, el carbohidrato, y el metabolismo de las proteínas	Crecimiento atrofiado, las yemas de las hojas terminales mueren, las puntas de las hojas se vuelven blancas y las hojas se estrechan y tuercen
Boro (BO_3^-)	Implicado en crecimiento del tubo de la germinación y del polen, división de célula, metabolismo del nitrógeno	Los brotes terminales mueren, formación del rosetón, flor o vertimiento de la fruta
Molibdeno (MoO_4^-)	Componente esencial de la reductasa del nitrato y de la nitrogenasa, es importante en la fijación de N por las legumbres	Se asemeja al síntoma de la deficiencia de N, enfermedad de la cola del azote de la coliflor
Cloro (Cl^-)	Implicado en la evolución del oxígeno en el	Necrosis foliar

	fotosistema II de la fotosíntesis, elevando la presión osmótica de la célula	
--	--	--

Realizado por Jikson Ruiz, 2018

Fuente: (Prasad Ragedra & Power James, 2008).

1.1.1.3 Características biológicas

1.1.1.3.1 Microorganismos

La actividad y población de los microorganismos varía en función de la textura del suelo, pH, temperatura y suministro de agua, oxígeno, carbono y nitrógeno. (Prasad Ragedra & Power James, 2008).

- **Hongos:** los hongos son un grupo de organismos microscópicos que tienen micelio formado por un conjunto de filamentos ramificados llamados hifas, no realizan fotosíntesis, por lo que necesitan obtener compuestos carbonados de las plantas que parasitan para de esta manera alimentarse, y pueden degradar compuestos orgánicos muy resistentes.
- **Nematodos:** los nematodos son lombrices pequeñas, generalmente microscópicas, parecidas a las anguilas. Muchos nematodos son inofensivos, mientras que otros atacan y se alimentan de plantas cultivadas para alimentos, estos atacan partes de plantas por encima del suelo (hojas, tallos y semillas), y otras se alimentan de en o en las raíces. Los nematodos que se alimentan de la raíz interfieren directamente con el agua y la toma de nutrientes. Los síntomas típicos de las plantas hospederas incluyen atrofia, coloración amarillenta y pérdida de vigor. (Milne, 1998).
- **Actinomicetos:** los actinomicetos son bacterias Gram positivas, muchos presentan filamentos ramificados, algunos muestran características pleomórficas e incluso cocoides. Están ampliamente distribuidos en el suelo, compostaje, agua y en otros ambientes. Además, tiene un papel importante en la producción de antibióticos y otros metabolitos útiles. (Goodfellow, 2008).

1.1.1.3.2 Actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática es conocida como un biomarcador, es decir, es un indicador de diferentes condiciones de calidad de suelo, la actividad enzimática del suelo es de interés primario en la comprensión de la descomposición de la materia vegetal, y se utilizan a menudo como índices de la actividad microbiana y de la fertilidad del suelo. Están involucrados en la transferencia de energía, la calidad ambiental y la productividad de los cultivos debido que las enzimas intervienen en la mayoría de los procesos que tienen lugar en el suelo y las funciones que realizan son de gran importancia, estas son responsables de la formación de moléculas orgánicas y particularmente tienen una participación vital en el ciclo del nitrógeno, fósforo y carbono, así como también cumplen un papel fundamental en procesos como la mineralización, inmovilización de nutrientes y fijación biológica de nitrógeno, entre otros. (Peart Robert & Shoup W, 2004; Henríquez, *et al.*, 2014).

Estas enzimas del suelo son extracelulares y liberadas durante el metabolismo y muerte celular, otras son intracelulares y que forman parte de la biomasa microbiana o bien adsorbidas en la materia orgánica y en el sistema coloidal, es decir, que el suelo puede actuar como un reservorio temporal, sin embargo en un momento dado la actividad enzimática podría no estar ligada necesariamente con la actividad microbiana.

Las enzimas se pueden clasificar en:

- **Oxidorreductasas:** como la catalasa, glucosa, oxidasa, deshidrogenasa y peroxidasa.
- **Tranferasas:** como la transaminasa.
- **Hidrolasas:** como la celulasa, lipasa, β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa. (Henríquez, *et al.*, 2014).

Las enzimas como la deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa han sido utilizadas en la agronomía como indicadores para evaluar los efectos que presenta el manejo agrícola sobre las características de calidad del suelo, ya que estas enzimas fundamentalmente son responsables de la liberación de carbono, nitrógeno, y fósforo, nutrientes necesarios e indispensables para las plantas. (Henríquez, *et al.*, 2014).

1.1.2 Usos del suelo

El uso del suelo tiene que ver con la distribución y propiedades de diferentes tipos de tierra con la combinación de propiedades del suelo, clima y relieve determinando el potencial de la tierra para diferentes usos. Los usos generalmente:

- **Forestales:** cultivo de especies maderables, leñosas, y/o pastoreo.
- **Agrícolas:** cultivo de especies para consumo y nutrición del ser humano
- **Industriales:** instalaciones para procesamiento y transformación de materias primas. (Last, *et al.*, 2013).

1.2 Agroquímicos

Los agroquímicos son sustancias cuyo objetivo es controlar, prevenir, o destruir cualquier plaga y/o agentes causantes de enfermedades de los cultivos. Los agroquímicos más utilizados son los fertilizantes y plaguicidas. (Altman, 2006).

1.2.1 Plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias químicas o biológicas usadas para matar o controlar plagas, consecuentemente el objetivo de los plaguicidas es conseguir una producción elevada en cantidad y calidad. Las tres clases principales de plaguicidas son: insecticidas, fungicidas, y herbicidas (o matadores de malezas). También hay rodenticidas, nematicidas, molusquicidas, y acaricidas. Estos productos químicos son típicamente compuestos orgánicos sintéticos, pero hay excepciones que son derivados de plantas o minerales inorgánicos que ocurren naturalmente. (Waxman, 2012).

1.2.1.1 Insecticidas

Los insecticidas son aquellos que controlan insectos que constituyen una plaga para los cultivos, como por ejemplo minadores (*Liriomyza trifolii*), trips (*Frankliniella occidentalis*), pulgones (*Aphididae*), escarabajos (*Coleoptera*), polillas (*Tineola bisselliella*), etc. (Ortiz, 2011). En la Tabla 2-1., se resume algunos insecticidas según su composición química. (Yáñez, 2008).

Tabla 2-1 Insecticidas según su composición química

Insecticidas	Ejemplos
Organoclorados	Aldrin, Endosulfan, DDT, 2-4-5 T, Clordano, Toxaafeno, Dierdrín, Endrín, Clordimeform, etc.
Organofosforados	Monocrotofos, Metamidofos, Etoprof, Fenamifos, Clorpirifos
Carbamatos	Aldicarb, Carbofuram, Bendiocarb, Proporxur, Pirimicarb, Carbarilo
Piretroides	Permetrina, Alfamestrina, Cipermetrina, Ciflutrin
Piretrinas	Derivados de la planta del piretro
Dinitrofenoles	Trifrina (DNOC)
Azufre y derivados	Kumulos
Biológicos	Bacillus, Azadiractina

Realizado por: Jikson Ruiz

Fuente: (Yáñez, 2008).

1.2.1.2 Fungicidas

Los fungicidas actúan contra hongos causantes de enfermedades en los cultivos, como mildiu, oídio, podredumbres, *Fusarium*, *Verticlium*, *Botrytis*, etc. En la Tabla 3-1, se presenta algunos fungicidas de mayor importancia y los más utilizados por los agricultores. (Yáñez, 2008).

Tabla 3-1 Fungicidas según su composición química

Fungicidas	Ejemplos
Tiocarbamatos	Thiram
Diotiocarbamatos/Etilenbisditiocarbamatos	Maneb, Zineb, Mancozeb
Compuestos de cobre	Óxido cuproso, óxido cúprico, oxiclururo de cobre

Triazoles	Penconazol, Bitertanol, Tebuconazol, Triadimefon
Imidazoles	Fuberidazol
Ftalimidas	Captan, Captafol, Folpet

Realizado por: Jikson Ruiz
Fuente: (Yáñez, 2008).

1.2.1.3 Herbicidas

Los herbicidas son químicos utilizados para controlar las malezas. Los herbicidas pueden ser de contacto o acción sistemática.

- De contacto: los herbicidas de contacto matan solamente las partes de la planta que el producto químico toca.
- De acción sistemática o sistémica: los herbicidas sistémicos son absorbidos por las raíces o el follaje y transportados por toda la planta. Generalmente, son eficaces en las plantas perennes porque el producto alcanza todas las partes de la planta incluso raíces profundas y vástagos leñosos, que son relativamente inaccesibles.

La actividad del herbicida es selectiva o no se puede seleccionar. Los herbicidas selectivos se utilizan para matar malas hierbas sin daño significativo a las plantas cercanas, mientras que los herbicidas no seleccionados son productos químicos que matan a todas las plantas presentes si se aplican a una dosis y concentración adecuada. (Waxman, 2012).

En la Tabla 4-1, se muestra algunos herbicidas de mayor importancia y los más utilizados por los agricultores.

Tabla 4-1 Herbicidas según su composición química

Herbicidas	Ejemplos
Compuestos fenoxiacéticos	Derivados del ácido fenoxiacético, por ejemplo: 2-4 D, Diclorprof, etc.

Bipiridilios	Paraquat, Diquat
Triazinas	Atrazina, Terbutrina, Simazina, Metribuzin
Derivados de la urea	Linuron, Diuron, Monuron
Derivados de los ácidos tricloroacético y tricloropicolínico	Dalapon
Arsenicales orgánicos	Arseniato de calcio, arseniato de cobre, arseniato de plomo

Realizado por: Jikson Ruiz
Fuente: (Yáñez, 2008).

1.2.1.4 Acaricidas

Los acaricidas son utilizados para el control de ácaros (*Acarus siro Linnaeus*), por ejemplo: araña roja (*Tetranychus urticae*), araña blanca (*Polyphagotarsonemus latus*), vasates (*Aculops lycopersici*), etc. (Ortiz, et al., 2011).

1.2.1.5 Nematicidas

Los nematicidas son empleados para el control de nematodos, por ejemplo: *Globodera*, *Meloidogyne*, etc. (Salmeron, 2002).

1.2.1.6 Molusquicidas

Los molusquicidas son aquellos que controlan los caracoles (*Helix aspersa*) y babosas (*limaco*), generalmente de las hortalizas. (Yáñez, 2008).

1.2.1.7 Rodenticidas

Los rodenticidas son utilizados para controlar ratas (*Rattus*), ratones (*Mus*), raposas (*Didelphimorphia*), etc. Son anticoagulantes (cumarina, brodifacouma y dodecalciferol). (Yáñez, 2008).

1.3 Fuentes de contaminación

El resultado de la utilización de plaguicidas es el la contaminación ambiental, ya sea por fuentes puntuales o no puntuales.

1.3.1 Fuentes puntuales.

La contaminación desde el punto de origen proviene de un lugar específico e identificable, como por ejemplo: el derrame del pesticida que se mueve directo a una alcantarilla, los derrames producidos en los sitios de limpieza de equipos, eliminación inadecuada de los recipientes, el agua de ríos, lagos, pozos de los recipientes de enjuague y exceso de pesticidas, sitios de almacenamiento de pesticidas donde las fugas y derrame no se limpian correctamente, derrames que se producen mientras se mezclan concentrados o cargan pesticidas en el equipo de aplicación.

1.3.2 Fuentes no puntuales.

La contaminación de fuentes no puntuales proviene de un área amplia, la aplicación de plaguicidas ha contribuido generalmente a la contaminación por plaguicidas en el ambiente exterior. (Salmeron, 2002).

Muchos usos de los pesticidas se restringen debido a preocupaciones ambientales. Siempre que se libere un pesticida en el ambiente, ya sea intencional o accidentalmente, se debe considerar:

- Si hay áreas sensibles en el medio ambiente en el sitio del pesticida que podría ser dañado por el contacto con el pesticida.
- Si hay áreas sensibles fuera del área cerca del sitio de uso que podría ser perjudicado por el contacto con el pesticida.
- Si hay condiciones en el ambiente en el sitio del uso del pesticida que podría hacer que el pesticida se mueva fuera del sitio. (Salmeron, 2002).

1.4 Áreas sensibles

Las áreas sensibles son sitios o cosas vivas que son fácilmente lesionadas, afectadas por un pesticida. Las áreas sensibles al aire libre incluyen:

- Áreas en o cerca del agua superficial.
- Áreas cercanas a escuelas, parques infantiles, hospitales, etc.
- Áreas cercanas a jardines ornamentales, alimentos o cultivos alimenticios, u otras plantas sensibles.

Las áreas sensibles en el interior incluyen:

- Áreas donde las personas, especialmente los niños, mujeres embarazadas, ancianos, o los enfermos vivan, trabajen o sean atendidos.
- Áreas donde se procesan alimentos o piensos, se preparan, se almacenan o se sirven.
- Áreas donde los animales domésticos o confinados viven, comen o son de otra manera cuidados.
- Áreas donde se cultiven o mantengan plantas ornamentales o de otro tipo.

1.5 Movimiento de los pesticidas

Los pesticidas que se alejan del sitio de liberación pueden causar contaminación ambiental. Los pesticidas se mueven de varias maneras, incluyendo:

- En aire, a través del viento o a través de corrientes de aire generadas por sistemas de ventilación.
- En agua y suelo, a través de escurrimiento o lixiviación.
- En objetos, plantas o animales (incluidos los humanos) que se mueven o se mueven fuera del sitio.

Debido al movimiento de los pesticidas en el ambiente se puede contaminar el aire, agua y suelo.

1.5.1 Contaminación del aire

El movimiento del pesticida lejos del sitio se llama generalmente deriva. Las partículas de pesticidas, polvos, gotitas de rociado y vapores pueden ser llevadas fuera del aire. Las personas que mezclan, cargan y aplican pesticidas al aire libre por lo general son conscientes de la facilidad con que los pesticidas derivan fuera del sitio. Las personas que manejan pesticidas en interiores pueden no darse cuenta de la facilidad con que algunos pesticidas se mueven fuera del sitio en las corrientes de aire creadas por los sistemas de ventilación y por los sistemas de calefacción y refrigeración por aire forzado. (Sasek, *et al.*, 2003).

1.5.1.1 Partículas y gotas

Las partículas ligeras, tales como polvos y polvos húmedos, son llevadas fácilmente por el aire móvil, los gránulos y las pelotillas son mucho más pesados y tienden a colocarse fuera del aire rápidamente y las gotas pequeñas del aerosol también se llevan fácilmente en corrientes de aire. Los inyectores de alta presión y finos como el aerosol producen las gotas más pequeñas que son muy probables de arrastrar. La presión más baja y los inyectores gruesos producen gotas más grandes con menos potencial de la deriva. (Sasek, *et al.*, 2003).

La probabilidad de que las partículas de pesticidas y las gotas de rocío sean llevadas fuera del sitio depende en parte de la forma en que se liberan. Los pesticidas liberados cerca del suelo o del piso no son tan susceptibles de ser atrapados en corrientes de aire como los liberados de una mayor altura. Los pesticidas aplicados en una dirección ascendente o de un avión son los más probables ser transportados en corrientes de aire. (Sasek, *et al.*, 2003).

1.5.1.2 Vapores

Los vapores de los pesticidas se mueven fácilmente en el aire, los pesticidas fumigantes tienen la intención de formar un vapor cuando se liberan. Las personas que utilizan

fumigantes deben tomar precauciones para asegurarse de que el fumigante permanezca en un recipiente sellado hasta que se libere en el sitio de la aplicación, que también debe sellarse para evitar que el vapor escape. Algunos pesticidas no fumigantes también pueden vaporizarse y escaparse al aire. El etiquetado de plaguicidas volátiles a menudo incluye declaraciones de advertencia que la persona que los va a manipular debe prestar atención. Cada vez que se libere un pesticida volátil en un área cerrada, se debe considerar los peligros no sólo para el que manipula, también para las personas cercanas, los animales y las plantas que se encuentran en o cerca del sitio de liberación o que pueden entrar al área poco después de la liberación. (Salmeron, 2002).

Las declaraciones típicas de etiquetado de pesticidas que le alertan para evitar la deriva incluyen:

- No lo aplique cuando las condiciones climáticas favorezcan la deriva de áreas tratadas.
- Derivar de áreas tratadas puede ser peligroso para los organismos acuáticos en las áreas vecinas. (Yáñez, 2008).

1.5.2 Contaminación del agua

Las partículas y líquidos de pesticidas pueden ser llevados fuera del agua. Los pesticidas pueden entrar en el agua a través:

- De lixiviación y escurrimiento de aplicaciones cercanas.
- Derrames, fugas en los sitios de mezcla, carga, almacenamiento y limpieza de equipos cercanos.
- Eliminación incorrecta de pesticidas, rociadores y recipientes. (Valdes, 2000).

La mayoría del movimiento de pesticidas en el agua es a través de la superficie tratada (escurrimiento) o hacia abajo de la superficie (lixiviación). El escurrimiento y la lixiviación pueden ocurrir cuando:

- Se aplica demasiado pesticida líquido, y/o por filtración o derrame sobre una superficie.

- Demasiada lluvia, agua de irrigación u otras aguas se filtren en una superficie que contiene residuos de pesticidas. (Ortiz, *et al.*, 2011).

El agua de escurrimiento en el ambiente exterior puede viajar en zanjas de drenaje, arroyos, estanques u otras aguas superficiales donde los pesticidas pueden transportarse a grandes distancias fuera del sitio. Los pesticidas que se lixivian hacia abajo a través del suelo en el entorno de superación a veces llegan al agua subterránea. El agua del escurrimiento en el ambiente de interior puede entrar en sistemas de agua doméstica y de allí en agua superficial y agua subterránea. El escurrimiento puede fluir en desagües del piso u otros desagües y en el sistema de agua. A veces la persona que manipula los pesticidas por descuido dispone el pesticida por un desagüe del fregadero y dentro del sistema de agua. (Valdes, 2000).

Algunos pesticidas pueden lixiviar hacia abajo en ambientes interiores. En un invernadero, por ejemplo, los pesticidas pueden lixiviar a través del suelo u otros medios de siembran a los pisos o a los bancos abajo. Algunos pesticidas usados en interiores pueden ser absorbidos en alfombras, madera y otras superficies porosas y permanecen atrapados durante mucho tiempo. (Valdes, 2000).

Las declaraciones típicas de etiquetado de pesticidas que le alertan de estas preocupaciones incluyen:

- No contamine el agua a través del escurrimiento, derrames o eliminación incorrecta del exceso de pesticidas, mezclas de rociado.
- No permita que el escurrimiento o rociado contamine pozos, zanjas de irrigación, o cualquier cuerpo de agua utilizado para irrigación o propósitos domésticos.
- No aplique directamente al agua y a los humedales (pantanos).
- Este producto es soluble en agua y puede moverse con agua de escorrentía superficial.
- No contamine las tierras de cultivo, agua o acequias. (Ortiz, *et al.*, 2011).

1.5.3 Contaminación del suelo

La contaminación en el suelo se debe tanto a tratamientos específico (insecticidas en el suelo, desinfectantes, tratamientos de surco o de semillas, y de modo especial herbicidas

de pre-siembra y pre-emergencia), como también por contaminación proveniente de tratamientos, al caer al suelo el excedente de los mismos o ser arrastrados por la lluvia las partículas depositadas en las plantas. Muchos pesticidas (la mayoría de herbicidas, derivados fosfóricos y carbámicos, etc.) sufren una rápida degradación microbiana en el suelo y sus residuos desaparecen en un plazo o menos corto. En su acumulación influye el tipo de suelo, los arcillosos y orgánicos retienen mayor cantidad de residuos que los arenosos. Los mayores riesgos se presentan en la aplicación de derivados clorados de difícil eliminación o que exige largo tiempo, razón por la que tales derivados se encuentran siempre involucrados en la problemática de residuos, acumulación y contaminación en general. (Barberá, 2008).

1.6 Biorremediación de suelos contaminados

La biorremediación es una técnica en la que se aplica microorganismos para remediar los suelos contaminados. Esta técnica combina microbiología, avances de la biotecnología y la ingeniería ambiental. (Atlas M. & Philp J, 2005).

1.6.1 Biomagnificación

La biomagnificación implica la amplificación progresiva a través de una cadena alimenticia, la biomagnificación se asocia generalmente a los compuestos orgánicos hidrofóbicos, como los pesticidas organoclorados. Los tóxicos tomados por un organismo vivo pueden ser metabolizados a una forma más soluble y excretados o almacenados en tejidos no directamente implicados en el metabolismo, por ejemplo, los depósitos de pelo y grasa. La biomagnificación tiene lugar cuando un depredador consume un organismo que contiene un tóxico bioacumulado. A medida que el tóxico pasa por la cadena alimenticia, tiene el potencial de amplificar a cada nivel trófico. (Sing A., Parmar N., Kuhad R., 2011).

1.6.2 Bioacumulación

La bioacumulación es una que implica la toma del contaminante del ambiente en concentraciones bajas, por toma activa (común para los compuestos hidrofílicos) o por difusión pasiva (común para los compuestos hidrofóbicos), y la acumulación dentro del

organismo a niveles mucho más altos. La bioacumulación ocurre con muchos contaminantes tóxicos, incluyendo los metales, y los factores de acumulación que pueden ser muy altos, de niveles muy bajos de contaminación. (Sing A., Parmar N., Kuhad R., 2011).

1.6.3 Biocontrol

El biocontrol o control biológico se define como la reducción o protección de poblaciones de plagas por enemigos naturales como los predadores, parásitos, patógenos (bacterias, hongos y virus). (Atlas M. & Philp J, 2005).

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Diseño experimental

2.1.1 *Tipo y diseño de investigación*

El presente trabajo que se basó en la “**Evaluación de la actividad enzimática de hongos y bacterias procedentes de un suelo agrícola contaminado con plaguicidas de la parroquia San Luis para la elección del microorganismo más eficiente para su biorremediación**”, se enmarca como investigación DOCUMENTAL, EXPLICATIVA y EXPERIMENTAL.

La recopilación de datos que explican la influencia de los pesticidas muy frecuentemente utilizados en la actividad agrícola y que inciden sobre las poblaciones de microorganismos presentes en estos suelos muestra una investigación documental. Así mismo, la explicación de las hipótesis planteadas en las variables consideradas permitirá advertir si a pesar de la incidencia de los pesticidas en este suelo aún existen microorganismos eficientes.

Finalmente, la fase experimental está dada por los datos de ensayos establecidos para observar y registrar el comportamiento y la afectación reflejada en los microorganismos responsables de la actividad biológica del suelo, considerada uno de los parámetros más importantes desde el punto de vista de la fertilidad de un suelo, característica esencial en la actividad agrícola y consecuentemente la productividad.

2.1.2 *Unidad de análisis*

La unidad de análisis fue el Kg de suelo/ sitio, 1 Kg de suelo correspondiente a una muestra compuesta representativa del área total en estudio (1380 m²). El muestreo se realizó, utilizando el método combinado, para lo cual se tomaron 15 sub muestras de suelo

de la superficie destinada al cultivo de frutilla (*Fragaria* spp.) a campo abierto y otras 15 sub muestras del suelo fueron tomadas del área destinada al cultivo de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*) bajo invernadero.

2.1.3 Población de estudio

La población de estudio está representada por la cantidad de bacterias, hongos y actinomicetes que fueron aislados de cada una de las muestras compuestas procedentes del sitio en estudio.

2.1.4 Tamaño de muestra

De acuerdo a las recomendaciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), se realizó un muestreo sistemático con patrón en zig-zag, para obtener una muestra compuesta de cada una de las áreas, una con cultivo de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*) y la otra con el cultivo de frutilla (*Fragaria* spp.), 15 sub muestras de suelo fueron tomadas de cada parcela de muestreo a partir de las cuales se obtuvo 0,5 Kg de suelo para los respectivos análisis en el Laboratorio (Sosa, D. 2012).

Para la evaluación enzimática, la muestra fue de 74 microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetes) procedentes del área destinada al cultivo de frutilla, mientras que 60 microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetes) fueron obtenidos del área del cultivo de tomate.

2.1.5 Selección de muestra

Todos los aislamientos (bacterias, hongos y actinomicetes) obtenidos de cada muestra (1Kg c/u) en cultivo puro, fueron utilizados para los ensayos de pruebas bioquímicas, actividad enzimática y crecimiento de los microorganismos bajo la influencia de los pesticidas comúnmente utilizados en estos cultivos.

2.2 Metodología

2.2.1 Localización de la experimentación

La fase experimental de este trabajo de titulación fue realizada en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales. ESPOCH. Localizada en la Panamericana Sur Km 1 ½ Riobamba.

2.2.2 Lugar del muestreo

Las muestras de suelo y consecuentemente los microorganismos procedentes de éstas (bacterias hongos y actinomicetes) fueron obtenidos en las coordenadas 1° 43' 0.26" S y 78° 38' 29.84" O, sector San Vicente de Tiazo, parroquia San Luis. Provincia de Chimborazo.

2.2.3 Caracterización básica de las muestras de suelo

La caracterización básica de las muestras de suelo se fundamentó en la determinación del pH y el porcentaje de humedad, características físico-químicas incidentes en la obtención de las poblaciones microbianas

2.2.3.1 Determinación del pH

Se colocaron 20 gramos de suelo en un vaso de precipitación y se añadió 50 mL de agua destilada hasta obtener una película de aproximadamente 1 cm de altura sobre el suelo. La suspensión se agitó por varios minutos y posteriormente se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, utilizando un pHmetro calibrado (McKean, 1993), y sin agitar la muestra, se tomaron 2 lecturas de pH, con las cuales se realizó el promedio y se obtuvo el valor final.

2.2.3.2 Determinación del porcentaje de humedad

Para la determinación de humedad, se pesó una cápsula de porcelana previamente esterilizada con alcohol (P1). Utilizando las muestras homogeneizadas, se colocó una

cierta cantidad de suelo en la cápsula (P2), y se llevó a la estufa a 105°C por 2 horas. Para obtener el peso de la muestra de suelo tomada (P3) se utilizó la siguiente expresión:

$$P3 = P2 - P1$$

Una vez transcurrido el tiempo establecido se sacó la muestra de la estufa y se dejó enfriar al ambiente por unos minutos hasta obtener una temperatura uniforme. Se pesó nuevamente la cápsula (P4) y para obtener el valor del peso seco de la muestra (P5), se realizó la siguiente operación:

$$P5 = P4 - P1$$

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \left(\frac{P5}{P3} \times 100 \right)$$

(Gujarro, 2011).

2.2.4 Aislamiento y purificación de microorganismos

2.2.4.1 Aislamiento de microorganismos

De cada una de las muestras compuestas, se tomó 10 g de suelo que fueron colocados en un blanco de dilución de 90 mL, las muestras fueron agitadas a 1500 rpm durante 30 minutos, a partir de ésta, se prepararon las diluciones hasta 10⁻⁶. Todas las diluciones fueron inoculadas en cajas Petri que contenían PDA (Potatoe Dextrose Agar) y NA (Nutrient Agar) tomando 50 µL, y por el método de difusión en placa el inóculo fue extendido sobre los medios de cultivo, las placas inoculadas fueron incubadas a 25 °C ± 1 hasta observar el crecimiento de colonias microbianas (Tortora, G.J. Funke, B. R & Case, C. L. 2007).

2.2.4.2 Obtención de cultivos puros de microorganismos

Todas las cajas Petri que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias de bacterias, hongos y actinomicetes fueron seleccionadas para proceder con el aislamiento y purificación de los microorganismos. Con la ayuda de un palillo estéril se tomó parte de una colonia o micelio con esporas, para inocular en cajas Petri que contenían Potatoe Dextrose Agar (PDA) en el caso de hongos y algunos actinomicetes y Nutrient Agar (NA) mediante el método en estrías simples, para las bacterias (Sanders, E. R. 2012). Todos los

platos sembrados fueron incubados a 28°C por 96 horas. Aquellos cultivos que se encontraron puros fueron repicados en estrías compuestas en nuevas cajas monopetri con PDA y NA respectivamente. Todos los cultivos contaminados fueron repicados hasta obtener cultivo puro.

2.2.5 Almacenamiento y conservación de los cultivos obtenidos

Los cultivos puros de bacterias, hongos y actinomicetes fueron almacenados y para su conservación a largo plazo se realizó la transferencia de material de cada colonia hacia un criovial que contenía 1 mL de glicerol al 20% (w/v). Los tubos preparados fueron almacenados en un congelador a -20°C.

En el caso de algunos hongos y actinomicetes se prepararon suspensiones de esporas que fueron mantenidas en refrigeración a 4°C, hasta su posterior uso durante la realización de los otros ensayos complementarios.

2.2.6 Identificación de microorganismos basada en pruebas bioquímicas

2.2.6.1 Prueba de Oxido/Fermentación

Para la prueba de óxido/fermentación se utilizó el medio Hugh & Leifson (Anexo A), que sirve para observar si los microorganismos utilizan un proceso metabólico oxidativo o fermentativo. Se utilizaron dos tubos con 10 mL del medio O/F a los cuales se añadió el inóculo respectivo de los aislamientos obtenidos. Luego uno de los tubos fue sellado con aceite mineral para impedir la entrada de oxígeno (tubo cerrado) y el otro no fue sellado (tubo abierto). Los tubos fueron incubados a 35°C durante 48 horas para su evaluación.

2.2.6.2 Prueba de Utilización de Citrato

La prueba de utilización del citrato permite diferenciar Enterobacterias o microorganismos con vías metabólicas similares, se utilizó el medio Citrato de Simmons (Anexo B), para identificar a los microorganismos capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono y las sales de amonio del medio como única fuente de nitrógeno. En dos tubos con 10 mL del medio Citrato de Simmons se añadió 15 µL de inóculo de cada uno de los aislamientos obtenidos. Los tubos con el agar inclinado fueron inoculados e incubados a 35°C durante 72 horas para su evaluación.

2.2.6.3 Prueba enzimática en relación al oxígeno: Catalasa

Esta prueba muestra la capacidad de varios microorganismos para degradar agentes oxidantes producidos por reacciones metabólicas oxidativas propias del metabolismo aerobio. Se procedió al cultivo de los aislamientos en cajas cuatri Petri colocando 30 μL de inóculo de cada microorganismo. Luego se incubaron las cajas durante 72 horas a 35°C hasta observar su crecimiento. Posteriormente, sobre cada colonia se añadió 3 gotas de peróxido de hidrógeno al 10% para observar la intensidad de la reacción (desprendimiento de oxígeno).

2.2.6.4 Actividad amilolítica (hidrolisis del almidón)

Mediante la hidrólisis de polisacáridos como el almidón, efectuada por algunos microorganismos, se forman sustancias más sencillas y fácilmente asimilables en la nutrición microbiana. Para la determinación de la actividad amilolítica de los aislamientos microbianos, se procedió a inocular 20 μL de la suspensión de los hongos y las bacterias y 50 μL de la suspensión de actinomicetes en cajas cuatri Petri las mismas que contenían el medio de inducción Agar Almidón (Anexo C).

Las cajas sembradas fueron incubadas a 35°C durante 72 horas y luego se procedió a la evaluación por reacción cromogénica colocando el revelador (Lugol al 0.05%) durante 5 minutos para observar la formación de halos y medirlos.

2.2.6.5 Actividad lignocelulolítica

Para la evaluación de la actividad lignocelulolítica se procedió a inocular 20 μL de la suspensión de los hongos y bacterias y 50 μL de la suspensión de actinomicetes en cajas cuatri Petri las mismas que contenían el medio de inducción Agar CMC (Anexo D). Las cajas sembradas fueron incubadas a 35°C durante 72 horas y luego se procedió a la colocación de 8 mL de Rojo Congo al 0.05% y se dejó actuar este revelador, concluido el tiempo se retiró el excedente del revelador y se añadió NaCl 0.1M dejándolo reposar por 15 minutos más, transcurridos los 15 minutos, se retiraron los excesos y se observaron y midieron los halos de hidrolisis.

2.2.6.6 Degradación de la Caseína

Las proteasas producidas por varios microorganismos y excretadas al medio para degradar proteínas, favorecen ciertas rutas metabólicas y/o reducen toxicidad en el metabolismo microbiano. Para observar la degradación de la caseína se inoculó 20 µL de la suspensión de los hongos y las bacterias y 50 µL de la suspensión de actinomicetes en cajas cuatri Petri las mismas que contenían el medio Agar leche descremada (Anexo E). Las cajas sembradas fueron incubadas a 35°C durante 72 horas y luego se procedió a la valoración de la hidrólisis por degradación del medio.

2.2.7 Influencia de pesticidas en la morfología de colonia de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de suelo del sitio en estudio

El medio básico PDA enriquecido con 1g de dextrosa/litro, fue esterilizado a 121°C durante 20 minutos, antes de que el medio sea vertido en las cajas cuatri Petri, se añadió las dosis de pesticidas que son utilizados en el manejo de los cultivos de frutilla y tomate riñón del sitio de estudio. Tryclán + Sharfip son utilizados en mezcla y Rugby es aplicado por separado.

De acuerdo a las condiciones de campo en los dos cultivos, las dosis manejadas por el agricultor son medias y de acuerdo a un aproximado se establecieron las siguientes dosis para el ensayo de prueba: Tryclán + Sharfip (2,5g: 2,5 mL) en 500 mL de medio de cultivo, y Rugby 1 g en 500 mL.

El ensayo se estableció con dos tratamientos y un control codificados de la siguiente manera:

T1: Insecticida/Insecticida (Tryclán: 0,50 Kg/Ha + Sharfip: 1,25mL/Litro)

T2: Insecticida-Nematicida (Rugby: 20 g/planta)

T3: Control (sin insecticidas)

En cada uno de los tres tratamientos, se inocularon 20 µL de los 132 aislamientos. Luego las cajas inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 72 horas. Concluido el tiempo de incubación se procedió al registro de datos de crecimiento y observación morfológica de las colonias de bacterias, hongos y actinomicetes

estableciendo las diferencias y/o alteraciones entre los tratamientos establecidos en el ensayo.

2.2.8 *Diseño estadístico*

El análisis estadístico para diferenciar la actividad enzimática presentada por los aislamientos, se realizó utilizando pruebas estadísticas no paramétricas, debido a la que los datos no fueron homogéneos, mediante el test de Kruskal – Wallis se determinó si la actividad enzimática de los aislamientos difirió entre sí para **p < 0.05**.

Mientras que en el análisis estadístico para diferenciar la influencia de los pesticidas (insecticidas) en la morfología de las colonias de los aislamientos de bacterias, hongos y actinomicetes, se utilizó la estadística descriptiva mediante Tablas de Contingencia para representar simultáneamente los caracteres observados en la población de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetes) en estudio.

CAPÍTULO III

3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Localización de la experimentación

La fase experimental de este trabajo de titulación fue realizada en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicado en las coordenadas 17M 158247.00 m Este 9816895.00 m Sur y 2821 m.s.n.m.; en la Carretera Panamericana Sur Km 1 ½, Parroquia Lizarzaburu, de la Provincia de Chimborazo, Cantón Riobamba.

3.2 Lugar del muestreo

Las muestras de suelo y consecuentemente los microorganismos procedentes de éstas (bacterias hongos y actinomicetes) fueron obtenidos en las coordenadas 1° 43` 0.26”S y 78° 38` 29.84” O, sector San Vicente de Tiazo, parroquia San Luis. Provincia de Chimborazo. Figura 1-3.



Figura 1-3 Ubicación geográfica del sitio en estudio.
Realizado por Jikson Ruiz, 2018.

3.3 Caracterización preliminar de las muestras de suelo

Las dos muestras de suelo obtenidas del sitio de estudio, fueron caracterizadas para dos parámetros influyentes en el desarrollo de las comunidades microbianas, como son el pH y el porcentaje de humedad Tabla 5-3. La muestra de suelo procedente del cultivo de frutilla presenta un pH ligeramente ácido y un porcentaje de humedad mayor frente a la muestra de suelo procedente del cultivo de tomate riñón que tiene un pH ligeramente alcalino y un porcentaje de humedad menor.

Tabla 5-3 Codificación y caracterización de las muestras de suelo.

Muestra	Código	Ph	Denominación	Humedad (%)
Suelo frutilla	SF	6.8	Ligeramente ácido	55,86%
Suelo tomate	ST	7.5	Ligeramente alcalino	53,38%

Realizado por Jikson Ruiz. 2018

Fuente: Laboratorio de Ciencias Biológicas. ESPOCH, 2018.

El pH como la humedad del suelo, son determinantes para el crecimiento de los grupos de microorganismos. La disponibilidad de agua (humedad) es considerada la mayor limitante en el crecimiento microbiano, tanto las bacterias como los hongos que son los grupos predominantes se ven favorecidos en su crecimiento bajo condiciones de humedad adecuada, tendiendo a alta (Dannemiller *et al.*, 2017). Así mismo, varios estudios demuestran que el crecimiento bacteriano pero sobre todo fúngico es mayor cuando los niveles de pH del suelo son menores o tienden a la neutralidad (Rouska *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en las dos muestras de suelo, concuerdan con lo expresado por los autores mencionados ya que la mayor población microbiana obtenida en este estudio fue la procedente de la muestra de suelo con cultivo de frutilla de pH neutro y mayor porcentaje de humedad. Por el contrario, la muestra de suelo con cultivo de tomate, con menor humedad y un pH ligeramente alcalino, presenta menor población microbiana, lo que puede ser atribuido a la acumulación de sales, a causa de varios procesos, como la eliminación inadecuada de residuos procedentes de fertilizaciones y plaguicidas que frecuentemente son retenidos en la fracción coloidal propia de la estructura de este tipo de suelos, afectando así el pH y consecuentemente el óptimo desarrollo de las poblaciones microbianas (Sánchez & Sánchez, 1984).

3.4 Aislamiento y purificación de microorganismos

A partir de la caracterización básica de las muestras de suelo, se procedió al aislamiento de todas las colonias (bacterias, hongos y actinomicetes) que crecieron en los medios básicos, Potatoe Dextrosa Agar (PDA) y Agar Nutriente (AN) y que mostraron diferencias morfológicas, un total de 134 microorganismos fueron aislados, de los cuales 75 proceden de la muestra SF y 59 de la muestra ST. Luego de purificar algunos de estos aislamientos y de acuerdo a la morfología característica de los grupos de microorganismos como se muestra en la Figura 2-3, 77 cultivos presentaron morfología de bacterias, 30 colonias son hongos y 26 aislamientos son actinomicetes.

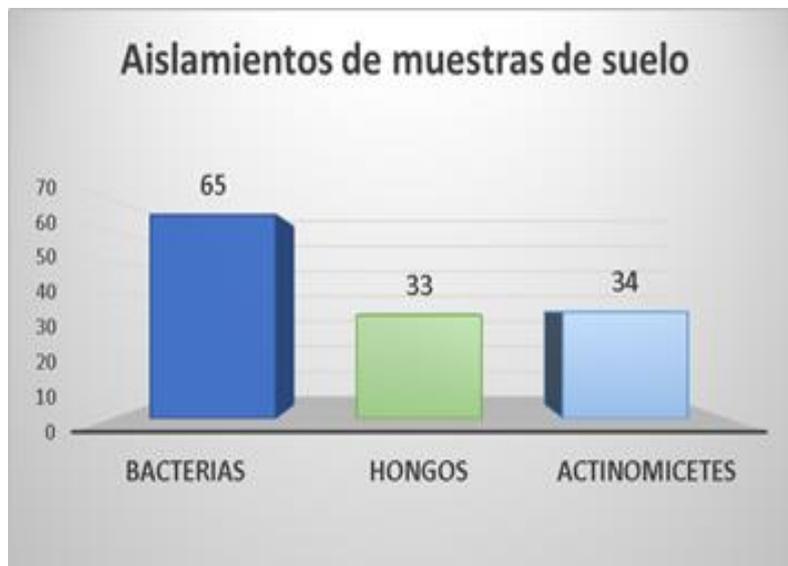


Figura 2-3 Aislamientos microbianos obtenidos de las muestras de suelo en estudio.
Realizado por: Jikson Ruiz, 2018.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en varios estudios, que afirman que el número de células y la biomasa microbiana está estrechamente ligada al tipo de partículas predominantes del suelo, en éste caso arcilla y limo, comúnmente las bacterias son predominantes llegando a concentraciones de 10^9 células/g de suelo sin contar con las no cultivables (Garbeva *et al.*, 2004); luego está la masa fúngica que a pesar de ser menor, juega un rol muy importante en la degradación de la materia orgánica cuando ésta está presente en un suelo (Sessitsch *et al.*, 2001); y aunque los actinomicetes están ampliamente distribuidos en diferentes hábitats, y tienen habilidad para sobrevivir bajo ciertas condiciones extremas (Ghorbani-Nasrabadi *et al.*, 2013), no es menos cierto que su crecimiento y consecuentemente su concentración en los suelos que puede fluctuar

entre 10^4 – 10^6 esporas/gramo se ve favorecida o limitada por la humedad, pH, materia orgánica, mesofauna y temperatura (González, 2010).

3.5 Almacenamiento y conservación de los cultivos obtenidos

Una vez obtenidos los cultivos puros e identificados por morfología de colonias, los 134 aislamientos fueron almacenados en crioviales de 2 mL, células bacterianas y esporas de hongos y/o actinomicetes fueron suspendidas en una solución de glicerol a 20%, para ser mantenidas en congelación a -20°C de temperatura.

Además los 134 aislamientos fueron codificados de acuerdo a la denominación utilizada en la Colección de microorganismos del Laboratorio de Ciencias Biológicas, desde el **DCB-2951** hasta el **DCB-3084**.

3.6 Identificación de microorganismos basada en Pruebas bioquímicas

Los 134 aislamientos en cultivo puro, con nueva codificación, fueron sometidos a la aplicación de pruebas bioquímicas que determinan la actividad metabólica de bacterias, hongos y actinomicetes para ser identificados y agrupados de acuerdo a su reacción. Esta identificación se basa en sustratos y actividad enzimática (oxidación/fermentación), producción de metabolitos secundarios, entre otros (López-Hontangas *et al.*, 2006).

3.6.1 Prueba de Oxido/Fermentación

De los 134 aislamientos, sometidos a la prueba de Oxido/Fermentación (ANEXO F), los aislamientos correspondientes a los códigos DCB-3045 y DCB-3084 fueron eliminados del ensayo debido a su crecimiento tardío, frente a los demás aislamientos al tiempo de la evaluación.

De los 132 aislamientos, sometidos a la evaluación, 57 dieron resultado positivo para el proceso fermentativo, 35 fueron positivos tanto para oxidación como para fermentación, 17 solo tomaron la vía oxidativa mientras que 23 aislamientos fueron negativos para la oxido/fermentación como se muestra en la Figura 3-3.

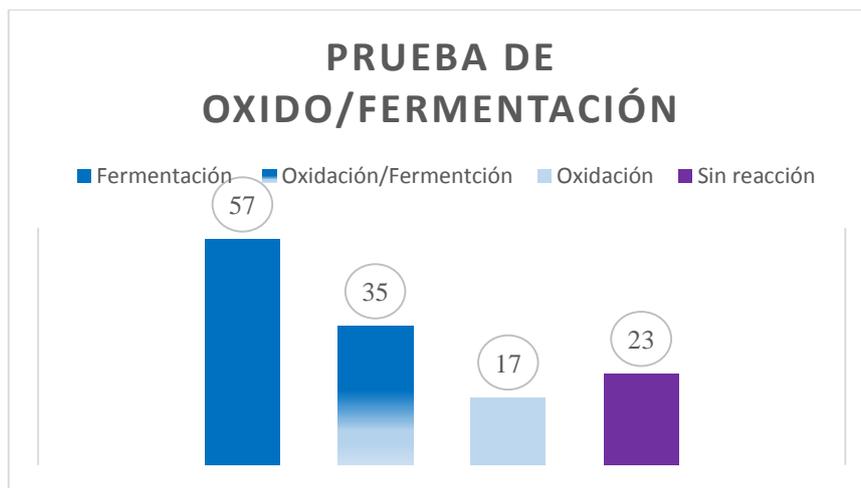


Figura 3-3 Resultados de la Prueba de O/F de los 132 aislamientos microbianos.
Realizado por: Jikson Ruiz, 2018.

Estos resultados muestran la diversidad metabólica presente en este grupo de microorganismos siendo predominante la vía fermentativa donde el aceptor final de los electrones es cualquier compuesto orgánico. Sin embargo, un segundo grupo utiliza un metabolismo combinado de oxidación y fermentación muy común en los microorganismos que utilizan varias estrategias metabólicas bajo diferentes condiciones favoreciendo así su prevalencia en ambientes incluso extremos; consecuentemente su metabolismo combinado constituye un criterio fundamental incluso para entender el papel ecológico de estos microorganismos en determinados ambientes (Roszak & Colwell, 1987; Leonard *et al.*, 2010).

Con respecto a los aislamientos que no presentaron ni actividad oxidativa ni actividad fermentativa, se puede inferir que su metabolismo es dependiente o específico de otros compuestos, así como también de que corresponden a microorganismos sintróficos cuya característica es la unión a otras especies para beneficiarse o ejecutar alguna reacción química para su metabolismo (Corrales *et al.*, 2015).

Por lo descrito, dentro del metabolismo quimio-organo-heterótrofo presente en la mayoría de los microorganismos, representado por la respiración aeróbica, anaeróbica, fermentación y oxidación incompleta, y que implican secuencias de reacciones catalizadas enzimáticamente, el mayor número de microorganismos aislados del sitio en estudio, utilizan a la fermentación para su producción de energía y aunque hay varios tipos de fermentaciones todas llevan a una oxidación parcial del carbono (Varela & Grotiuz, 2002).

3.6.2 Prueba de Utilización de Citrato

De los 132 aislamientos sometidos a la prueba de utilización de citrato, 30 aislamientos dieron positivo mediante el viraje del indicador a alcalino, mientras que los 102 restantes fueron negativos, como se muestra en la Figura 4-3.



Figura 4-3 Resultados de la Prueba de Utilización de Citrato de los 132 aislamientos microbianos. **Realizado por:** Jikson Ruiz, 2018.

Los resultados observados (ANEXO G) concuerdan con la afirmación de que solo un número reducido de microorganismos tienen habilidad para fermentar el citrato gracias a que son poseedores de la enzima citrato permeasa una intermediaria clave en el ciclo de Krebs presente en los microorganismos aerobios, sin embargo, hay otros microorganismos capaces de fermentar el citrato aun en ausencia de oxígeno cuando pierden o tienen un ciclo de Krebs defectivo, incluso bajo condiciones de anaerobiosis donde el ciclo de Krebs no es funcional. Consecuentemente la fermentación de citrato da lugar a una variedad de productos metabólicos e implica el transporte de compuestos a través de proteínas de membrana específicas las mismos que dependen tanto del género microbiano pero sobre todo de las condiciones óptimas de crecimiento de los diferentes grupos de microorganismos (Cohen & Monod, 1957; Quintans *et al.*, 2008; Isokpehi *et al.*, 2014).

3.6.3 Prueba enzimática en relación al oxígeno: Catalasa

Los 132 aislamientos utilizados para la ejecución de la prueba de catalasa que fue evaluada a las 72 horas, permitió la discriminación de 11 aislamientos entre bacterias hongos y actinomicetes, correspondientes a los códigos DCB-2952, DCB-2959, DCB-

2960, DCB-2963, DCB-2967, DCB-2973, DCB-2979, DCB-2980, DCB-2982, DCB-3025, DCB-3042, debido a su retardo en el crecimiento (ANEXO H).

Los aislamientos restantes fueron evaluados para la reacción de la catalasa, en función de la siguiente escala arbitraria en relación al burbujeo: 0 = sin reacción; 1= reacción baja; 2 = reacción media y 3 = reacción abundante. De los 121 aislamientos, 33 no presentaron reacción, 38 tuvieron reacción baja, 40 mostraron una reacción media y 10 cultivos tuvieron reacción abundante, Figura 5-3.

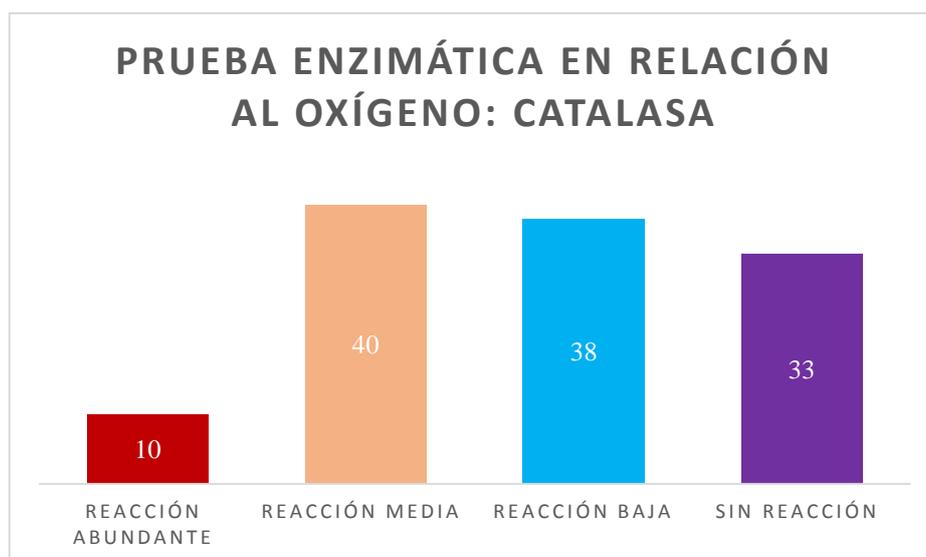


Figura 5-3 Resultados de la Prueba Enzimática en relación al oxígeno: Catalasa, de los 132 aislamientos microbianos. **Realizado por:** Jikson Ruiz, 2018.

Los resultados muestran que más del 70% de los aislamientos podrían dar un aporte significativo en la actividad metabólica, si consideramos que la producción de la catalasa va ligada a la oxidasa y que estas enzimas degradan compuestos tóxicos como el peróxido presente en el metabolismo oxidativo (López-Hontangas *et al.*, 2006; Singh, 2015). Además, la prueba de catalasa sirve para la identificación entre microorganismos ya que el sistema citocromo solo está presente en microorganismos aerobios, aerófilos y anaerobios facultativos, y en grupos como el de Enterobacterias la reacción de la catalasa es negativa (McCord, Keele & Fridovich, 1971; Flackman & Elliot, 1995; Vaquer-Sunser & Duarte, 2010; Hemrai *et al.*, 2013). De acuerdo a esta afirmación, los 33 aislamientos que no presentaron reacción podrían pertenecer a algunos géneros de Enterobacterias capaces de adaptarse y convivir con el resto de microbiota del suelo en estudio.

3.6.4 Prueba de la actividad amilolítica (hidrólisis del almidón)

La actividad amilolítica por parte de los microorganismos mostró resultados positivos para 106 aislamientos mientras que sólo 26 aislamientos no mostraron actividad, Figura 6-3. Es decir alrededor del 80% de los aislamientos obtenidos de las muestras de suelo del sitio en estudio producen complejos enzimáticos responsables de la actividad amilolítica (Anexo I), lo cual concuerda con lo reportado en varios estudios que afirman que una amplia variedad de los microorganismos entre hongos, bacterias y actinomicetes tanto mesofílicos como termofílicos facultativos, tienen la capacidad de producir estas enzimas (endo y exo amilasas) que juegan un papel fundamental en la trans-glicosilación de compuestos. Las amilasas también juegan un rol importante en la escisión eliminativa del pectato produciendo oligosacáridos más accesibles para la nutrición y metabolismo microbiano (Vihinen & Mantsiila, 1989; Naidu, 2013; Adav *et al.*, 2015; Kahil *et al.*, 2015).



Figura 6-3 Resultados de la Prueba de actividad amilolítica de los 132 aislamientos microbianos. **Realizado por:** Jikson Ruiz, 2018.

3.6.5 Actividad lignocelulolítica

La prueba de actividad lignocelulolítica ejecutada en los 132 aislamientos dieron como resultado que el 50% (Anexo J), es decir 67 microorganismos obtenidos de las muestras de suelo en estudio presentan actividad lignocelulolítica, mientras que los otros 65 no mostraron actividad alguna, Figura 7-3. Estos resultados indican que aunque el complejo lignocelulosico es un material orgánico presente en toda la biomasa vegetal, la

complejidad de su estructura química dificulta su degradación que frecuentemente es llevada a cabo por la actividad enzimática de microorganismos. Bajo este contexto, una gran diversidad de hongos productores de enzimas principalmente ligninolíticas, son los responsables de dar inicio a la acción catalítica sin descartar a las bacterias lignocelulolíticas que son más eficientes y permiten una mejor separación de la lignina y de la celulosa (Woo *et al.*, 2014). La degradación de la celulosa, hemicelulosa pero particularmente de la lignina que es más resistente al ataque microbial, requiere de oxígeno, de ahí que varios reportes indican que un solo microorganismo no sería eficiente en la bioconversión, frente a un complejo microbiano constituido de hongos ascomicetes, basidiomicetes, bacterias aeróbicas, anaeróbicas, y actinomycetes que son más eficientes a la hora de modificar la lignina y transformar otros residuos lignocelulolíticos a azúcares (Ahmed *et al.*, 2001; Dashtban *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2014). También los complejos lignocelulolíticos juegan un rol importante a la hora de catalizar la primera etapa que es crítica en la transformación de varios xenobióticos presentes en el suelo que obstaculizan el transporte de sustancias o la producción de enzimas ligninolíticas en el suelo, ya que participan en una gran variedad de mecanismos versátiles de descomposición para lograr una descontaminación (Lang *et al.*, 1997; CajthamL, 2015).

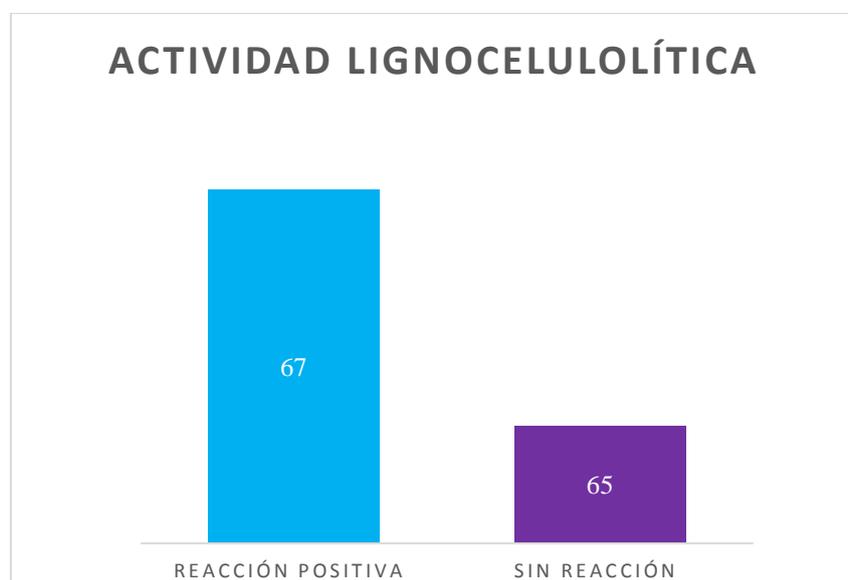


Figura 7-3 Resultados de la Prueba de actividad lignocelulolítica de los 132 aislamientos microbianos
Realizado por: Jikson Ruiz, 2018.

3.6.6 Degradación de la Caseína

Solo 32 aislamientos correspondientes al 25% del total de cultivos en estudio (ANEXO K) tuvieron actividad positiva en la degradación de caseína, Figura 8. Aunque las enzimas proteolíticas están presentes en todos los seres vivos y son esenciales en el crecimiento y diferenciación, las proteasas microbianas juegan un rol crucial en la interacción hospedero-patógeno, degradación de sustratos como elastina, colágeno y proteoglicanos (Sinha *et al.*, 2013). Particularmente, la actividad catalítica para degradar caseína, llevada a cabo por las proteasas microbianas, exo-enzimas que degradan péptidos de caseína mediante reacciones hidrolíticas hasta obtener aminoácidos libres (Mierau *et al.*, 1997). Además, la actividad de las proteasas es un indicador de la fertilidad de un suelo, ya que es responsable de la mineralización del nitrógeno, actuando sobre los grupos amino de las proteínas, comúnmente las proteasas que hidrolizan la caseína están en los grupos de microorganismos asociados con materia orgánica, incluso con la materia orgánica que no ha sido humificada del suelo (Bonmati, 1998; Mireles *et al.*, 2014).

Los microorganismos que no presentaron actividad catalítica en el sustrato caseína, pueden conformar otros grupos con proteasas específicas capaces de desdoblar otros sustratos y catalizar diversas reacciones como ocurre con proteasas que hidrolizan enlaces amídicos en proteínas y péptidos (Choe *et al.*, 2006); otros en cambio cumplen funciones de maduración de compuestos y apoptosis como ocurre con la familia de las proteasas intracelulares específicas de citosina (Talanian *et al.*, 1997) por solo mencionar algunos de ellos.



Figura 8-3 Resultados de la Prueba de Degradación de la Caseína de los 132 aislamientos microbianos. **Realizado por:** Jikson Ruiz, 2018.

3.6.7 Determinación del crecimiento microbiano bajo la influencia directa de pesticidas

El impacto e influencia de los pesticidas en las comunidades microbianas presentes en los suelos, en ocasiones es evaluada en vista de su papel en el mantenimiento del ciclo global de la materia y sus funciones en el crecimiento vegetal, sin embargo, las condiciones de estrés a las que se exponen estos microorganismos también es un parámetro de evaluación del impacto de los pesticidas (Engelen *et al.*, 1998). La diversidad microbiana también es considerada como parámetro de evaluación, ya que ésta es crucial en la calidad del suelo, puesto que garantiza la sostenibilidad a largo plazo y la resistencia a las perturbaciones ocasionadas tras cada ciclo de cultivo (Bending *et al.*, 2007).

Los pesticidas disminuyen la actividad de enzimas influyendo en la mayoría de las reacciones bioquímicas: mineralización, nitrificación, denitrificación, amonificación, redox, metanogénesis (Hussain *et al.*, 2009; Rojas & Bedoya, 2013); y también afectan la morfo-fisiología de la microbiota del suelo, reduciendo, inhibiendo o anulando el crecimiento micelial, retardando o inhibiendo la esporulación y/o retardando el crecimiento (Castellanos González *et al.*, 2011).

Se observaron varios resultados en relación a la diversidad morfológica de colonias (ANEXO L), de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras compuestas de suelo del área en estudio y algunas características morfo-fisiológicas que fueron afectadas a causa de la exposición directa a la actividad de los insecticidas. A pesar de que se afirma que una característica de los insecticidas es su gran especificidad y baja toxicidad para el ambiente, varios estudios afirman que si existen impactos adversos de los insecticidas incluso sobre enemigos naturales de las plagas (Galvan *et al.*, 2005).

Algunas bacterias presentes en el suelo, también suelen ser afectadas por los insecticidas, aunque se afirma que las dosis de aplicación recomendada no afecta, la acumulación de residuos si va causando efectos en estas poblaciones, uno de los efectos principales es la supresión del crecimiento de algunos géneros bacterianos (Quinchía *et al.*, 2006), los actinomicetes no están exentos, aunque hay grupos muy activos debido a la secreción de metabolitos que suelen tener mejores mecanismos de resistencia o compatibilidad con

algunos insecticidas, otros géneros como *Nocardia* y *Micromonospora* suelen ser fuertemente afectados anulando su crecimiento (Das & Mukherjee, 2000); también los hongos sufren afectaciones en el crecimiento micelial y en la germinación de esporas consiguientemente se anula por completo el crecimiento fúngico (Asi *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este ensayo con los 132 aislamientos concuerdan con lo descrito por los autores mencionados, ya que se observaron comportamientos similares como la degradación de inóculos bacterianos, aceleración y/o retraso de esporulación en ciertos aislamientos, anulación del crecimiento, crecimiento micelial lento y cambios en la coloración y morfología de colonias. El impacto adverso de los insecticidas aparentemente puede mitigarse a través de una mejor elección del insecticida, la dosis pero sobre todo el momento de aplicación del insecticida.

3.7 *Análisis de resultados de la actividad enzimática cualitativa (\emptyset = mm de halos de hidrólisis)*

Para el análisis de los resultados de la actividad enzimática amilolítica, lignocelulolítica y de degradación de caseína, se compararon los diámetros de los halos de hidrólisis presentados por los aislamientos. Todos los resultados obtenidos fueron analizados sin exclusión alguna utilizando el software IBM SPSS Statistics 22, y mediante el test de Kruskal – Wallis aplicable para la comparación de tres o más grupos independientes.

En la Tabla 6-3, se muestran las diferencias significativas entre las pruebas de actividad enzimática de los aislamientos en estudio para un nivel de significación $p \leq 0.05$, el análisis muestra un valor de significancia ($X^2 = 121,831; p = 0,000$) concluyendo entonces que los aislamientos en estudio muestran diferencias a la hora de degradar sustratos como el almidón, lignina, celulosa y caseína.

Tabla 6-3 Test de Kruskal – Wallis para la Actividad enzimática (amilolítica, lignocelulolítica y degradación de caseína) de los 132 aislamientos microbianos.

Tratamiento	\bar{X} ($\emptyset = mm$)	Rango promedio
1 (Actividad. Amilolítica)	20,833	270,10 a
2 (Actividad Lignocelulolítica)	12,33	201,66 b
3 (Actividad en Caseína)	1,65	123,75 c

Realizado por: Ruiz, Jikson, 2018.

Las bacterias, hongos, levaduras y actinomicetes aislados del sitio en estudio fueron más eficientes en la actividad amilolítica, frente a la lignocelulolítica y de degradación de caseína, estos resultados concuerdan con lo manifestado por (Alariya *et al.*, 2013) que en su publicación afirman que las amilasas derivadas de varios hongos, levaduras, bacterias y actinomicetes pero principalmente las fúngicas y bacterianas constituyen una fuente importante debido a su plasticidad y amplia disponibilidad para el desarrollo del sector industrial. Así mismo, su capacidad para degradar polímeros complejos, proteínas, pectinas y celulosa mediante acción externa, endo-acción y desramificación, ha dado lugar al desarrollo y aplicación en varios sectores industriales (Naidu, 2013).

Aunque la actividad enzimática para degradar compuesto lignocelulolíticos fue menor, es importante considerar que en el grupo de aislamientos evaluados si existen microorganismos capaces de hacerlo, a pesar de la complejidad ya que algunos estudios muestran que varias enzimas están implicadas en la hidrólisis de cada componente de la lignocelulosa. Se afirma también que los glicósidos están implicados en la degradación de la lignina, ensayos in- vitro demuestran que incluso quinonas oxido reductasas como la celobiosa participan de la degradación, sin embargo, todas las enzimas implicadas en este proceso, algunas de ellas sin función identificada o mecanismo descrito, están presentes en muy pocas especies de hongo y bacterias; pero han sido los hongos filamentosos los catalogados como los mayores degradadores debido a su alta producción de complejos enzimáticos hidrolíticos, principalmente hongos basidiomicetes y ascomicetes han recibido mayor atención por su capacidad para degradar lignina y ser potenciales para biorremediación (Dekker, 1985; Wong *et al.*, 1988; Valaškova & Baldrian, 2006; CajthamL, 2015).

Por el contrario, este grupo de microorganismos no muestran eficiencia a la hora de degradar caseína, lo cual puede atribuirse a una menor concentración y/o ausencia de sistemas proteolíticos fundamentalmente proteasas extracelulares (Mierau *et al.*, 1997). Sin embargo, de los 32 aislamientos que si presentaron actividad, 19 tienen morfología bacteriana, 7 son hongos y 6 actinomicetes; este resultado concuerda con lo expresado por Das & Prasad, 2010, que indican que las proteasas bacterianas particularmente del género *Bacillus*, son más importantes que las procedentes de hongos ya que producen proteasas extracelulares específicas, eficientes para degradar varios sustratos entre ellos la caseína. Por su parte, los hongos elaboran una variedad más amplia de enzimas y aunque éstas son activas en un amplio rango de pH, exhiben una amplia especificidad de sustrato, baja tasa de reacción y no toleran el calor (Rao *et al.*, 1998). También algunos géneros de actinomicetes son capaces de producir una variedad de proteasas efectivas en condiciones alcalinas, neutras y sobre todo termoestables, sumado a otras enzimas tales como queratinasa, xilanasas, amilasa, quitinasa, celulasa, lipasa, fosfoesterasa y aminotransferasa favoreciendo así diferentes procesos de degradación (Ramesh *et al.*, 2009).

3.8 Análisis de la influencia de pesticidas en la morfología de colonia de los aislamientos obtenidos del sitio es estudio

Los resultados cualitativos obtenidos en la influencia de pesticidas en la morfología de colonia de los aislamientos en estudio, fueron analizados sin exclusión alguna, utilizando el software IBM SPSS Statistics 22, aplicando estadística descriptiva mediante Tablas de Contingencia, para registrar y comparar la asociación entre los pesticidas y su influencia en la morfología microbiana.

En la Tabla 7-3, se muestran el recuento y los porcentajes de los 132 aislamientos analizados, para establecer la relación existente entre el crecimiento y morfología de colonia, sin influencia de pesticidas y bajo la influencia de la mezcla de insecticidas Tryclan + Sharfip. Solo un microorganismos (**2994**) correspondiente al 0,8% fue capaz de crecer bajo la influencia de la mezcla de insecticidas Tryclan + Sharfip, sin embargo se observó una alteración morfo-fisiológica en la colonia de hongo puesto que esta no formó esporas como lo hizo bajo condiciones normales.

Tabla 7-3 Tabla de Contingencia Try+Sha * control de los 132 aislamientos microbianos.

			Control		Total
			0	2	
Try+Sha	0	% Recuento % dentro del control	5 100,0%	126 99,2%	131 99,2%
	1	% Recuento % dentro del control	0 0,0%	1 0,8%	1 0,8%
Total		% Recuento % dentro del control	5 100,0%	127 100,0%	132 100,0%

Realizado por: Ruiz, Jikson, 2018.

Estos resultados contrastan con la denominada especificidad que tienen los pesticidas (insecticida/nematicida), ya que, aunque Rugby está catalogado como un insecticida/nematicida de contacto, al ser un organofosforado es altamente tóxico (categoría II). Además frecuentemente los nematicidas tienen efectos secundarios contra insectos, malas hierbas y hongos (De la Flota & Ecuaquímica, 2015).

Aunque varios estudios reportan que los metabolitos procedentes de microorganismos particularmente hongos y bacterias, son capaces de degradar y disminuir el grado tóxico de los compuestos organofosforados, no es menos cierto que el uso continuo y excesivo de éstos causa gran deterioro en los suelos cultivables porque afecta otras poblaciones y conlleva a la pérdida de biodiversidad (Hernández-Ruiz *et al.*, 2017), afirmación que concuerda con lo demostrado en este estudio, ya que Rugby bajo influencia directa, afecta al crecimiento microbiano en un 99,2% del total de la población de bacterias, hongos y actinomicetes presentes en el suelo del sitio en estudio.

Por el contrario, en el análisis estadístico de la influencia de Rugby en el crecimiento y morfología de colonia de los 132 aislamientos, se observó crecimiento y morfología de colonia normal en 81 aislamientos correspondiente al 61,4% del total de la población, 44 aislamientos es decir el 33,3% de cultivos presentaron algún tipo de alteración morfofisiológica y tan solo 7 aislamientos que representan el 5,3% de la población fueron afectados en su crecimiento por influencia directa de Rugby, como se describe en la Tabla 8-3.

Tabla 8-3 Tabla de Contingencia Rugby*control de los 132 aislamientos microbianos.

			Control		Total
			0	2	
Rugby	0	% Recuento	3	4	7
		% dentro del control	60,0%	3,1%	5,3%
	1	% Recuento	1	43	44
		% dentro del control	20,0%	33,9%	33,3%
	2	% Recuento	1	80	81
		% dentro del control	20,0%	63,0%	61,4%
Total		% Recuento	5	127	132
		% dentro del control	100,0%	100,0%	100,0%

Realizado por: Ruiz, Jikson, 2018.

Estos resultados muestran que cuando los pesticidas (insecticidas) tienen menor toxicidad, las poblaciones microbianas son menormente afectadas. Tryclan comúnmente llamado Tiocyclam es un insecticida de origen biológico, moderadamente tóxico (categoría III), su rápida degradación y su movilidad moderada en el suelo impide el contacto con poblaciones microbiológicas consecuentemente no hay afectación sobre éstas (Verheye, W., 2006; Valarezo C. & Muñoz X., 2011).

Así mismo, Sharfip comúnmente llamado Fipronil es un insecticida ligeramente tóxico (categoría IV) a pesar de su naturaleza química, su amplio espectro y su acción de contacto pero sobre todo su molécula altamente activa, al parecer tienen gran especificidad solo por insectos chupadores, masticadores, perforadores y por ácaros; los residuos de Sharfip suelen ser degradados mediante tres vías: microbiana, química y por fotólisis. En la vía microbiana ciertos microorganismos particularmente bacterias son capaces de utilizar residuos de Fipronil como fuentes de carbono y energía para su crecimiento (Ying, G., & Kookana, R., 2002; Uniyal *et al.*, 2016).

Lo descrito, concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación ya que la mezcla de insecticidas menos tóxicos utilizados en el manejo de los cultivos de frutilla y tomate, no afectaron el crecimiento y morfología de las colonias de microorganismos, por el contrario el uso de un solo insecticida altamente tóxico afecta a las poblaciones microbianas presentes en un suelo, como se describe en la Tabla 9-3.

Tabla 9-3 Tabla de Contingencia Rugby*Try+Sha de los 132 aislamientos microbianos.

			Try + Sha			Total
			0	1	2	
Rugby	0	% Recuento % dentro de Try+Sha	7 100,0%	43 97,7%	81 100,0%	131 99,2%
	1	% Recuento % dentro de Try+Sha	0 0,0%	1 2,3%	0 0,0%	1 0,8%
Total		% Recuento % dentro de Try+Sha	7 100,0%	44 100,0%	81 100,0%	132 100,0%

Realizado por: Ruiz, Jikson, 2018.

A pesar de que los aislamientos, fueron obtenidos a partir de un suelo, cuya actividad agrícola utiliza estos insecticidas, se hubiera esperado que los aislamientos no fueran afectados, sin embargo, la exposición directa a sus compuestos activos refleja claramente la incidencia en las células microbianas y pone de manifiesto el riesgo constante de la diversidad microbiológica de los suelos utilizados para la producción agrícola.

CONCLUSIONES

- Los resultados cualitativos de la actividad enzimática para los 132 aislamientos entre bacterias, hongos y actinomicetes obtenidos a partir de las muestras de suelo procedentes de los cultivos de frutilla y tomate riñón, mostraron que a pesar de ser un suelo manejado con pesticidas, los microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetes) evaluados poseen complejos enzimáticos mayormente efectivos para degradar polisacáridos como el almidón, el compuesto más común de reserva en las plantas.
- Los aislamientos con morfología de hongos DCB 3031 y DCB 3043 fueron los más efectivos para hidrolizar almidón con diámetros por sobre los 40 mm, seguidos de otros 30 aislamientos correspondientes al 28,3% del total de pruebas positivas, con diámetros entre 35 y 41 mm.
- La evaluación cualitativa para la actividad enzimática lignocelulolítica reflejó que los microorganismos evaluados (bacterias, hongos y actinomicetes) fueron menos efectivos para degradar polímeros vegetales como lignina, hemicelulosa y celulosa presentes en diferente proporción de acuerdo a las especies vegetales, infiriendo que no son capaces de excretar enzimas extracelulares implicadas en estos procesos, ya sea por no poseerlas o porque la cantidad excretada de celulasas, endo y exoglucanasas, peroxidases, laccasas y otras es mínima y consecuentemente ineficiente.
- El actinomicete DCB 3025 fue el más efectivo en la actividad lignocelulolítica con un diámetro de 39 mm, seguido de los hongos DCB 3019 (38 mm), DCB 3010 (37 mm) y DCB 3007 (37 mm).
- Rugby influyó negativamente en el crecimiento y morfología de la colonia sólo en el 5,3% de aislamientos, mientras que el 33,3% sufrió algún tipo de alteración en la morfología de la colonia.
- La mezcla de insecticidas Tryclan + Sharfip influyó negativamente en el crecimiento y morfología de la colonia en el 99,2% de aislamientos evaluados en este estudio.
- Los hongos y el Actinomicete descritos, fueron los aislamientos más eficientes para la actividad enzimática, que pudieran ser utilizados como posibles biorremediadores de suelos agrícolas contaminados por manejo indiscriminado de pesticidas (insecticidas).

RECOMENDACIONES

- Determinar cuantitativamente la actividad de los complejos enzimáticos presentes en los microorganismos en estudio.
- Realizar la identificación molecular de los aislamientos más eficientes en la evaluación de la actividad enzimática.
- Establecer ensayos de biorremediación con los aislamientos más eficientes, utilizando diferentes muestras con diferentes contaminantes.
- Determinar el grado de residualidad de los pesticidas utilizados en los ciclos de cultivo, para mejorar la efectividad de degradación mediante procesos de bioaumentación.

BIBLIOGRAFÍA

1. ADAV, Sunil S.; RAVINDRAN, Anita; SZE, Siu Kwan. Quantitative proteomic study of *Aspergillus fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes. *Journal of proteomics*, 2015, vol. 119, p. 154-168.
2. AHMED, Zakaria, et al. Microbial activity on the degradation of lignocellulosic polysaccharides. *J. Biol. Sci*, 2001, vol. 1, no 10, p. 993-997.
3. ALARIYA, Shyam Sunder, et al. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. *Archives of applied science Research*, 2013, vol. 5, no 1, p. 15-24.
4. ARGUMEDO-DELIRA, Rosalba, et al. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 2009, vol. 25, no 4, p. 257-269.
5. ASI, Muhammad Ramzan, et al. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. *Pakistan Journal of Botany*, 2010, vol. 42, no 6, p. 4207-4214.
6. BENDING, Gary D.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. Sonia; LINCOLN, Suzanne D. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere*, 2007, vol. 69, no 1, p. 82-88.
7. CAJTHAML, Tomáš. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds by ligninolytic fungi: mechanisms involved in the degradation. *Environmental microbiology*, 2015, vol. 17, no 12, p. 4822-4834.
8. CASTELLANOS GONZÁLEZ, Leónides, et al. Efecto in vitro de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. *Fitosanidad*, 2011, vol. 15, no 1, p. 31-38.
9. CHOE, Youngchool, et al. Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, no 18, p. 12824-12832.
10. COHEN, Georges N.; MONOD, Jacques. Bacterial permeases. *Bacteriological reviews*, 1957, vol. 21, no 3, p. 169.
11. CORRALES, Lucia Constanza, et al. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 2015, vol. 13, no 24, p. 55-82.

12. DANNEMILLER, K. C.; WESCHLER, C. J.; PECCIA, J. Fungal and bacterial growth in floor dust at elevated relative humidity levels. *Indoor air*, 2017, vol. 27, no 2, p. 354-363.
13. DAS, ACh; MUKHERJEE, D. Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients. *Applied Soil Ecology*, 2000, vol. 14, no 1, p. 55-62.
14. DAS, Gitishree; PRASAD, M. P. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Int. Res. J. Microbiol*, 2010, vol. 1, no 2, p. 26-31.
15. DASHTBAN, Mehdi; SCHRAFT, Heidi; QIN, Wensheng. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International journal of biological sciences*, 2009, vol. 5, no 6, p. 578.
16. DE LA FLOTA, OPERACIÓN Y. MANTENIMIENTO; ECUAQUIMICA, DESECHOS ESPECIALES Y. PELIGROSOS. ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL EX POST.
17. DEKKER, ROBERT FH. Biodegradation of the hemicelluloses. *Biosynthesis and biodegradation of wood components*, 1985, p. 505-533.
18. ENGELEN, Bert, et al. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 64, no 8, p. 2814-2821.
19. FACKLAM, Richard; ELLIOTT, J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 1995, vol. 8, no 4, p. 479-495.
20. GALVAN, T. L.; KOCH, R. L.; HUTCHISON, W. D. Toxicity of commonly used insecticides in sweet corn and soybean to multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Economic Entomology*, 2005, vol. 98, no 3, p. 780-789.
21. GARBEVA, P. van; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2004, vol. 42, p. 243-270.
22. GHORBANI-NASRABADI, R., et al. Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase

- activity. *Journal of soil science and plant nutrition*, 2013, vol. 13, no 1, p. 223-236.
23. GOLOVLEVA, L. A., et al. The role and limitations of microorganisms, in the conversion of xenobiotics (IUPAC reports on pesticides no. 27). *Pure and Applied Chemistry*, 1990, vol. 62, no 2, p. 351-364.
 24. GONZÁLES, F. Contaminación Por fertilizantes:" Un serio problema ambiental. *Tingo María (Perú)*, 2011.
 25. GONZALES, Y. Los actinomicetos: Una visión como promotores de crecimiento vegetal. Asesora: Marcela Franco-Correa. *Tesis Titulo Profesional. Universidad Javeriana, Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria, Bogotá*, 2010.
 26. GUIJARRO, Tipán; CAROLINA, Diana. *Determinación de la producción de antibióticos por actinomicetes acidofílicos*. 2011. Tesis de Licenciatura.
 27. HERNÁNDEZ-RUIZ, Gina María; ÁLVAREZ-OROZCO, Natalia Andrea; RÍOS-OSORIO, Leonardo Alberto. Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 2017, vol. 18, no 1, p. 138-159.
 28. HEMRAJ, Vashist; DIKSHA, Sharma; AVNEET, Gupta. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare J Life Sci*, 2013, vol. 1, no 1, p. 1-7.
 29. HUSSAIN, Sarfraz, et al. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in agronomy*, 2009, vol. 102, p. 159-200.
 30. ISOKPEHI, Raphael D., et al. Evaluative profiling of arsenic sensing and regulatory systems in the human microbiome project genomes. *Microbiology insights*, 2014, vol. 7, p. MBI. S18076.
 31. JEFFRIES, Thomas W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. En *Biochemistry of microbial degradation*. Springer, Dordrecht, 1994. p. 233-277.
 32. KAHIL, Tarek; HASSAN, Helmy M. Economic co-production of cellulase and αamylase by fungi grown on agro-industrial wastes using solid-state fermentation conditions. *Science*, 2015, vol. 5, no 1, p. 184-195.
 33. KARAM, Miguel Ángel, et al. Plaguicidas y salud de la población. *CIENCIA ergo sum*, 2004, vol. 11, no 3.

34. LANG, E.; ELLER, G.; ZADRAZIL, F. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microbial ecology*, 1997, vol. 34, no 1, p. 1-10.
35. LEONARD, Effendi, et al. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no 31, p. 13654-13659.
36. LOPERA MESA, Margarita María, et al. Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. *Revista Facultad De Ingenieria Universidad De Antioquia*, 2005, no 33.
37. LÓPEZ-HONTANGAS, J. L.; CASTILLO, F. J.; SALAVERT, M. Técnicas de identificación. 2006.
38. Lu, L., Zeng, G., Fan, C., Zhang, J., Chen, A., Chen, M, & He, Y. (2014). Diversity of two-domain laccase-like multicopper oxidase genes in *Streptomyces* spp.: identification of genes potentially involved in extracellular activities and lignocellulose degradation during composting of agricultural waste. *Applied and environmental microbiology*, 80(11), 3305-3314.
39. MCCORD, Joe M.; KEELE, Bernard B.; FRIDOVICH, Irwin. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1971, vol. 68, no 5, p. 1024-1027.
40. MCKEAN, SHEILA. Manual de análisis de suelos y tejido vegetal: una guía teórica y práctica de metodologías. 1993.
41. MIERAU, Igor, et al. Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1997, vol. 14, no 1, p. 279-302.
42. MIRELES, CA Velázquez; MARTÍNEZ-TOLEDO, A.; ILIZALITURRI-HERNÁNDEZ, C. A. Actividad proteasa en suelos contaminados con metales pesados. *Memorias del curso Desarrollo de Proyectos*, 2014, p. 4.
43. NAIDU, M. A. Bacterial amylase a review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 2013, vol. 4, no 2.

44. ORTA ARRAZCAETA, Lissette. Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Fitosanidad*, 2002, vol. 6, no 3.
45. QUINCHÍA-FIGUEROA, Adriana María, et al. Evaluación de la resistencia de un aislado bacteriano nativo compatible con *Pseudomonas* sp. al insecticida Lorsban 4 EC. 2014.
46. QUINTANS, Nieves García, et al. Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. *Mol. Aspects Lactic Acid Bacteria Tradit. New Appl*, 2008, p. 65-88.
47. QUINTERO DÍAZ, Juan Carlos. Revisión: degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 2011, vol. 64, no 1.
48. RAMESH, Subramani; RAJESH, Mahalingam; MATHIVANAN, Narayanasamy. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2009, vol. 32, no 6, p. 791-800.
49. RAMÍREZ, J. A.; LACASAÑA, Matias. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 2001, vol. 4, no 2, p. 67-75.
50. RAO, Mala B., et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998, vol. 62, no 3, p. 597-635.
51. RODRÍGUEZ, D. Torres. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Revista Ecosistemas*, 2003, vol. 12, no 2.
52. ROJAS, Luz Yineth Ortiz, et al. Efecto de la aplicación de agroquímicos en un cultivo de arroz sobre los microorganismos del suelo. *Acta Agronómica*, 2013, vol. 62, no 1, p. 66-72.
53. ROSZAK, D. B.; COLWELL, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological reviews*, 1987, vol. 51, no 3, p. 365.
54. ROUSK, Johannes, et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal*, 2010, vol. 4, no 10, p. 1340.
55. SANDERS, Erin. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *J. Vis. Exp.* (63), e3064

56. SOSA, Domingo, Alberto. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Manejo de Suelos. Técnicas de toma y remisión de muestras de suelo. Argentina, 2012.
57. SÁNCHEZ, M. J.; SÁNCHEZ, M. Los Plaguicidas, Adsorción y Evolución en el Suelo. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. *Salamanca*, 1984.
58. SESSITSCH, Angela, et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no 9, p. 4215-4224.
59. SINGH, Sachin Kumar. *Isolation and characterization of bacteria isolated from municipal solid waste for production of industrial enzymes and waste degradation*. 2015. Tesis Doctoral. Dr. RAM MANOHAR LOHIA AVADH UNIVERSITY.
60. SINHA, Pallavi, et al. Characterization and optimization of alkaline protease enzyme produced by soil borne bacteria. *Trends in life science international journal*, 2013, vol. 2, no 2.
61. TALANIAN, Robert V., et al. Substrate specificities of caspase family proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no 15, p. 9677-9682.
62. TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana, 2007.
63. UNIYAL, Shivani, et al. Degradation of fipronil by *Stenotrophomonas acidaminiphila* isolated from rhizospheric soil of *Zea mays*. *3 Biotech*, 2016, vol. 6, no 1, p. 48.
64. VALAREZO CELY, Oswaldo; MUÑOZ CONFORME, Xavier. Insecticidas de uso agrícola en el Ecuador. 2011.
65. VALAŠKOVA, Vendula; BALDRIAN, Petr. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus*—production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology*, 2006, vol. 152, no 12, p. 3613-3622.
66. VAQUER-SUNYER, Raquel; DUARTE, Carlos M. Sulfide exposure accelerates hypoxia-driven mortality. *Limnology and Oceanography*, 2010, vol. 55, no 3, p. 1075-1082.
67. VARELA, G.; GROTIUZ, G. Fisiología y metabolismo bacteriano. *Uruguay, Editorial Cefa*, 2008, p. 43-58.

68. VIHINEN, Mauno; MANTSILA, Pekka. Microbial amyolytic enzyme. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 1989, vol. 24, no 4, p. 329-418.
69. VERHEYE, Willy H. (ed.). *Land Use, Land Cover and Soil Sciences-Volume IV: Land Use Management and Case Studies*. EOLSS Publications, 2009.
70. WONG, K. K.; TAN, L. U. L.; SADDLER, John N. Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological reviews*, 1988, vol. 52, no 3, p. 305.
71. WOO, Hannah L., et al. Enzyme activities of aerobic lignocellulolytic bacteria isolated from wet tropical forest soils. *Systematic and applied microbiology*, 2014, vol. 37, no 1, p. 60-67.
72. YING, Guang-Guo; KOOKANA, Rai. Laboratory and field studies on the degradation of fipronil in a soil. *Australian Journal of Soil Research*, 2002, vol. 40, no 7, p. 1095-1103.

ANEXO A Medio de Hugh & Leifson.

Medio Base	Cantidad / litro
Peptona	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato di básico de potasio	0,3 g
Azul de bromotimol	0,03 g
Agar	3 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,4± 0,2

ANEXO B Medio Citrato de Simmons

Reactivo	Cantidad / litro
Citrato de sodio	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato di potásico	1 g
Fosfato mono amónico	1 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15 g
Agua destilada	10000 ml
pH	6,9 ± 0,2

ANEXO C Medio de inducción Agar Almidón

Reactivo	Cantidad / litro
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	6 g
Almidón	2 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6,9 ± 0,2
Indicador	Lugol

ANEXO D Medio de inducción Agar CMC

Reactivo	Cantidad / litro
Carboximetilcelulosa 1%	10 g
Cloruro de amonio	1 g
Sulfato de amonio	1 g
Fosfato mono potásico	0,1 g
Cloruro de calcio	0,4 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Agar	15 g
pH	6,9 ± 0,2
Reveladores	
Rojo congo	0,1 %
Cloruro de sodio	0,1 M

ANEXO E Medio Agar leche descremada

Reactivo	Cantidad / litro
Leche descremada	
Caseína hidrolizada	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1 g
Agar	10 g
pH	7,0 ± 0,2

ANEXO F Resultados de la Prueba de O/F de los 132 aislamientos microbianos.

Código	Tubo abierto	Tubo sellado	Observaciones
2951	-	+	Fermentación
2952	-	+	Fermentación
2953	-	+	Fermentación
2954	+	+	Oxidación y Fermentación
2955	+	+	Oxidación y Fermentación
2956	-	+	Fermentación
2957	-	+	Fermentación
2958	+	+	Oxidación y Fermentación
2959	-	+	Fermentación
2960	+	+	Oxidación y Fermentación
2961	+	+	Oxidación y Fermentación
2962	-	+	Fermentación
2963	-	+	Fermentación
2964	+	+	Oxidación y Fermentación
2965	-	+	Fermentación
2966	-	+	Fermentación
2967	-	+	Fermentación
2968	+	+	Oxidación y Fermentación
2969	-	+	Fermentación
2970	-	+	Fermentación
2971	+	+	Oxidación y Fermentación
2972	+	+	Oxidación y Fermentación
2973	-	+	Fermentación
2974	-	+	Fermentación
2975	-	+	Fermentación
2976	-	+	Fermentación

2977	-	+	Fermentación
2978	-	+	Fermentación
2979	-	+	Fermentación
2980	-	+	Fermentación
2981	-	+	Fermentación
2982	-	+	Fermentación
2983	-	+	Fermentación
2984	-	+	Fermentación
2985	-	+	Fermentación
2986	-	+	Fermentación
2987	-	+	Fermentación
2988	-	+	Fermentación
2989	+	+	Oxidación y Fermentación
2990	-	+	Fermentación
2991	-	+	Fermentación
2992	-	+	Fermentación
2993	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
2994	-	+	Fermentación
2995	-	+	Fermentación
2996	-	+	Fermentación
2997	-	+	Fermentación
2998	-	+	Fermentación
2999	+	+	Oxidación y Fermentación
3000	-	-	Fermentación
3001	-	+	Ni oxidación/ni fermentación
3002	-	-	Oxidación y Fermentación
3003	+	+	Ni oxidación/ni fermentación
3004	-	-	Fermentación
3005	-	+	Fermentación
3006	-	+	Fermentación
3007	-	+	Fermentación
3008	-	+	Fermentación
3009	-	+	Fermentación
3010	-	+	Fermentación
3011	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3012	+	+	Oxidación y Fermentación
3013	+	+	Oxidación y Fermentación
3014	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3015	+	+	Oxidación y Fermentación
3016	-	+	Fermentación
3017	-	+	Fermentación
3018	-	+	Fermentación
3019	-	+	Fermentación
3020	-	+	Fermentación
3021	-	+	Fermentación
3022	-	+	Fermentación
3023	+	+	Oxidación y Fermentación

3024	-	+	Fermentación
3025	-	+	Fermentación
3026	+	+	Oxidación y Fermentación
3027	+	+	Oxidación y Fermentación
3028	+	+	Oxidación y Fermentación
3029	+	-	Oxidación
3030	-	+	Fermentación
3031	+	+	Oxidación y Fermentación
3032	+	+	Oxidación y Fermentación
3033	+	+	Oxidación y Fermentación
3034	+	+	Oxidación y Fermentación
3035	+	+	Oxidación y Fermentación
3036	+	+	Oxidación y Fermentación
3037	+	+	Oxidación y Fermentación
3038	+	+	Oxidación y Fermentación
3039	+	+	Oxidación y Fermentación
3040	-	+	Fermentación
3041	-	+	Fermentación
3042	+	+	Oxidación y Fermentación
3043	+	+	Oxidación y Fermentación
3044	+	+	Oxidación y Fermentación
3045			
3046	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3047	+	-	Oxidación
3048	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3049	+	-	Oxidación
3050	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3051	+	-	Oxidación
3052	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3053	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3054	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3055	+	-	Oxidación
3056	+	-	Oxidación
3057	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3058	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3059	+	-	Oxidación
3060	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3061	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3062	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3063	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3064	+	-	Oxidación
3065	+	-	Oxidación
3066	+	+	Oxidación y Fermentación
3067	+	-	Oxidación
3068	+	-	Oxidación
3069	+	+	Oxidación y Fermentación
3070	+	-	Oxidación

3071	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3072	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3073	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3074	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3075	+	-	Oxidación
3076	+	+	Oxidación y Fermentación
3077	+	-	Oxidación
3078	+	-	Oxidación
3079	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3080	+	-	Oxidación
3081	-	-	Ni oxidación/ni fermentación
3082	+	+	Oxidación y Fermentación
3083	+	-	Oxidación
3084			

ANEXO G Resultados de la Prueba de Utilización de Citrato de los 132 aislamientos microbianos.

Código	Reacción	Observaciones	Código	Reacción	Observaciones
2951	-		3018	-	
2952	-		3019	-	
2953	-		3020	-	
2954	-		3021	-	
2955	+	Medio alcalino	3022	-	
2956	-		3023	+	Medio alcalino
2957	-		3024	-	
2958	-		3025	-	
2959	-		3026	-	
2960	-		3027	-	
2961	-		3028	-	
2962	-		3029	-	
2963	-		3030	-	
2964	+	Medio alcalino	3031	-	
2965	-		3032	+	Medio alcalino
2966	-		3033	+	Medio alcalino
2967	-		3034	-	
2968	-		3035	-	
2969	-		3036	-	
2970	-		3037	+	Medio alcalino
2971	-		3038	-	
2972	-		3039	+	Medio alcalino
2973	-		3040	-	
2974	+	Medio alcalino	3041	-	
2975	-		3042	-	
2976	+	Medio alcalino	3043	-	
2977	+	Medio alcalino	3044	+	Medio alcalino
2978	+	Medio alcalino	3045		

2979	-		3046	+	Medio alcalino
2980	-		3047	+	Medio alcalino
2981	-		3048	-	
2982	-		3049	-	
2983	+	Medio alcalino	3050	-	
2984	-		3051	-	
2985	-		3052	-	
2986	-		3053	+	Medio alcalino
2987	-		3054	-	
2988	-		3055	+	Medio alcalino
2989	+	Medio alcalino	3056	-	
2990	-		3057	+	Medio alcalino
2991	-		3058	-	
2992	+	Medio alcalino	3059	-	
2993	-		3060	-	
2994	-		3061	-	
2995	-		3062	-	
2996	-		3063	-	
2997	-		3064	-	
2998	-		3065	-	
2999	-		3066	-	
3000	-		3067	-	
3001	-		3068	+	Medio alcalino
3002	-		3069	-	
3003	-		3070	-	
3004	-		3071	+	Medio alcalino
3005	-		3072	+	Medio alcalino
3006	-		3073	-	
3007	-		3074	+	Medio alcalino
3008	-		3075	+	Medio alcalino
3009	-		3076	-	
3010	-		3077	+	Medio alcalino
3011	-		3078	+	Medio alcalino
3012	-		3079	+	Medio alcalino
3013	-		3080	-	
3014	-		3081	+	Medio alcalino
3015	-		3082	-	
3016	-		3083	+	Medio alcalino
3017	-		3084		

ANEXO H Resultados de la Prueba Enzimática en relación al oxígeno: catalasa de los 132
aislamientos microbianos

Código	Escala	Observaciones	Código	Escala	Observaciones
2951	0	No presenta	3018	0	No presenta
2952	0	No presenta	3019	1	Baja
2953	1	Baja	3020	2	Media
2954	0	No presenta	3021	0	No presenta
2955	1	Baja	3022	2	Media
2956	1	Baja	3023	0	No presenta
2957	1	Baja	3024	1	Baja
2958	0	No presenta	3025	0	No presenta
2959	0	No presenta	3026	3	Abundante
2960	0	No presenta	3027	2	Media
2961	1	Baja	3028	2	Media
2962	1	Baja	3029	3	Abundante
2963	0	No presenta	3030	1	Baja
2964	1	Baja	3031	2	Media
2965	0	No presenta	3032	2	Media
2966	0	No presenta	3033	3	Abundante
2967	0	No presenta	3034	2	Media
2968	0	No presenta	3035	0	No presenta
2969	2	Media	3036	1	Baja
2970	0	No presenta	3037	2	Media
2971	1	Baja	3038	0	No presenta
2972	1	Baja	3039	2	Media
2973	0	No presenta	3040	2	Media
2974	0	No presenta	3041	1	Baja
2975	0	No presenta	3042	0	No presenta
2976	2	Media	3043	0	No presenta
2977	0	No presenta	3044	1	Baja
2978	0	No presenta	3045		
2979	0	No presenta	3046	0	No presenta
2980	0	No presenta	3047	2	Media
2981	1	Baja	3048	3	Abundante
2982	0	No presenta	3049	2	Media
2983	0	No presenta	3050	1	Baja
2984	1	Baja	3051	1	Baja
2985	0	No presenta	3052	1	Baja
2986	2	Media	3053	2	Media
2987	2	Media	3054	2	Media
2988	1	Baja	3055	2	Media
2989	3	Abundante	3056	2	Media
2990	1	Baja	3057	2	Media
2991	2	Media	3058	2	Media
2992	1	Baja	3059	2	Media
2993	0	No presenta	3060	1	Baja
2994	2	Media	3061	0	No presenta
2995	1	Baja	3062	2	Media
2996	1	Baja	3063	0	No presenta

2997	1	Baja	3064	2	Media
2998	0	No presenta	3065	3	Abundante
2999	1	Baja	3066	2	Media
3000	0	No presenta	3067	3	Abundante
3001	0	No presenta	3068	3	Abundante
3002	0	No presenta	3069	2	Media
3003	2	Media	3070	2	Media
3004	0	No presenta	3071	1	Baja
3005	0	No presenta	3072	1	Baja
3006	2	Media	3073	3	Abundante
3007	2	Media	3074	1	Baja
3008	0	No presenta	3075	1	Baja
3009	1	Baja	3076	2	Media
3010	1	Baja	3077	1	Baja
3011	2	Media	3078	3	Abundante
3012	1	Baja	3079	2	Media
3013	0	No presenta	3080	1	Baja
3014	0	No presenta	3081	2	Media
3015	1	Baja	3082	2	Media
3016	2	Media	3083	0	No presenta
3017	2	Media	3084		

ANEXO I Resultados de la Prueba de actividad amilolítica de los 132 aislamientos
microbianos

Código	Reacción	Ø mm	Código	Reacción	Ø mm
2951	+	35	3018	+	35
2952	-		3019	+	19
2953	+	20	3020	+	35
2954	+	15	3021	+	34
2955	+	24	3022	+	34
2956	+	23	3023	+	22
2957	+	19	3024	+	15
2958	+	35	3025	+	35
2959	-		3026	+	40
2960	+	35	3027	+	18
2961	+	35	3028	+	9
2962	+	30	3029	+	11
2963	-		3030	+	20
2964	-		3031	+	42
2965	-		3032	+	25
2966	-		3033	+	35
2967	-		3034	+	38
2968	+	35	3035	+	23
2969	+	35	3036	+	30
2970	+	35	3037	+	13
2971	+	35	3038	+	30
2972	+	15	3039	+	35

2973	-		3040	-	
2974	-		3041	+	34
2975	-		3042	-	
2976	+	19	3043	+	42
2977	-		3044	+	30
2978	+	37	3045		
2979	+	23	3046	+	39
2980	+	22	3047	-	
2981	+	22	3048	+	35
2982	+	17	3049	+	16
2983	+	11	3050	+	35
2984	+	35	3051	-	
2985	-		3052	+	15
2986	+	10	3053	+	31
2987	+	15	3054	+	32
2988	+	10	3055	+	15
2989	+	35	3056	+	33
2990	+	13	3057	+	13
2991	+	35	3058	+	37
2992	+	24	3059	+	17
2993	+	24	3060	+	31
2994	-		3061	+	10
2995	+	41	3062	+	7
2996	+	40	3063	-	
2997	+	40	3064	+	10
2998	+	20	3065	+	15
2999	+	24	3066	+	14
3000	+	17	3067	-	
3001	-		3068	+	22
3002	+	10	3069	+	23
3003	+	35	3070	+	21
3004	+	32	3071	-	
3005	+	35	3072	-	
3006	+	41	3073	+	11
3007	+	24	3074	+	18
3008	+	33	3075	+	38
3009	+	35	3076	+	35
3010	+	32	3077	-	
3011	+	29	3078	+	28
3012	+	27	3079	+	20
3013	+	28	3080	+	22
3014	+	13	3081	-	
3015	+	19	3082	-	
3016	+	15	3083	-	
3017	+	35	3084		

ANEXO J resultados de la Prueba de actividad lignocelulolítica de los 132 aislamientos
microbianos

Código	Reacción	Ø mm	Código	Reacción	Ø mm
2951	+	2	3018	-	
2952	-		3019	+	38
2953	-		3020	-	
2954	-		3021	-	
2955	+	4	3022	-	
2956	+	15	3023	-	
2957	-		3024	+	35
2958	+	27	3025	+	39
2959	-		3026	+	15
2960	+	15	3027	+	17
2961	-		3028	-	
2962	-		3029	-	
2963	+	31	3030	+	15
2964	-		3031	-	
2965	+	28	3032	-	
2966	+	29	3033	-	
2967	-		3034	-	
2968	+	35	3035	-	
2969	+	30	3036	+	17
2970	-		3037	-	
2971	+	20	3038	-	
2972	+	33	3039	+	35
2973	-		3040	-	
2974	-		3041	+	20
2975	-		3042	-	
2976	-		3043	-	
2977	-		3044	-	
2978	+	35	3045		
2979	+	11	3046	-	
2980	-		3047	-	
2981	+	12	3048	+	13
2982	-		3049	+	23
2983	-		3050	+	17
2984	+	22	3051	+	11
2985	+	21	3052	-	
2986	-		3053	+	22
2987	+	31	3054	-	
2988	-		3055	+	25
2989	-		3056	+	22
2990	-		3057	+	27
2991	+	22	3058	+	35
2992	+	20	3059	+	21
2993	-		3060	+	13
2994	-		3061	-	
2995	-		3062	+	22
2996	-		3063	-	

2997	-		3064	+	10
2998	-		3065	+	35
2999	+	30	3066	+	35
3000	-		3067	+	18
3001	-		3068	+	28
3002	+	22	3069	+	35
3003	+	35	3070	+	25
3004	+	35	3071	-	
3005	+	15	3072	+	18
3006	+	35	3073	-	
3007	+	37	3074	+	20
3008	+	26	3075	-	
3009	-		3076	+	33
3010	+	37	3077	-	
3011	+	35	3078	-	
3012	-		3079	+	18
3013	+	28	3080	+	30
3014	+	10	3081	-	
3015	+	35	3082	-	
3016	+	18	3083	-	
3017	-		3084		

ANEXO K Resultados de la Prueba de Degradación de la Caseína de los 132 aislamientos
microbianos

Código	Reacción	Código	Reacción	Código	Reacción
2951	+	2995	+	3040	+
2952	-	2996	-	3041	-
2953	-	2997	-	3042	-
2954	+	2998	+	3043	-
2955	-	2999	-	3044	-
2956	-	3000	-	3045	
2957	-	3001	-	3046	-
2958	-	3002	-	3047	-
2959	-	3003	-	3048	-
2960	-	3004	-	3049	-
2961	-	3005	-	3050	-
2962	-	3006	-	3051	-
2963	+	3007	-	3052	-
2964	-	3008	-	3053	-
2965	-	3009	-	3054	-
2966	-	3010	-	3055	-
2967	+	3011	-	3056	-
2968	-	3012	-	3057	-
2969	-	3013	-	3058	+
2970	-	3014	-	3059	+
2971	-	3015	+	3060	-
2972	-	3016	+	3061	-
2973	-	3017	-	3062	-

2974	-	3018	-	3063	+
2975	-	3019	-	3064	-
2976	-	3020	-	3065	-
2977	+	3021	-	3066	-
2978	-	3022	-	3067	-
2979	+	3023	-	3068	+
2980	+	3024	+	3069	+
2981	-	3025	+	3070	-
2982	-	3026	-	3071	-
2983	-	3027	+	3072	-
2984	-	3028	-	3073	-
2985	-	3029	-	3074	-
2986	+	3030	-	3075	-
2987	-	3031	-	3076	+
2988	-	3032	+	3077	-
2989	-	3033	+	3078	+
2990	-	3034	-	3079	+
2991	-	3035	-	3080	+
2992	-	3036	-	3081	+
2993	-	3037	-	3082	+
2994	+	3038	-	3083	+
		3039	+	3084	

ANEXO L Resultados de la Prueba de Crecimiento Microbiano bajo la actividad de los insecticidas utilizados en los cultivos

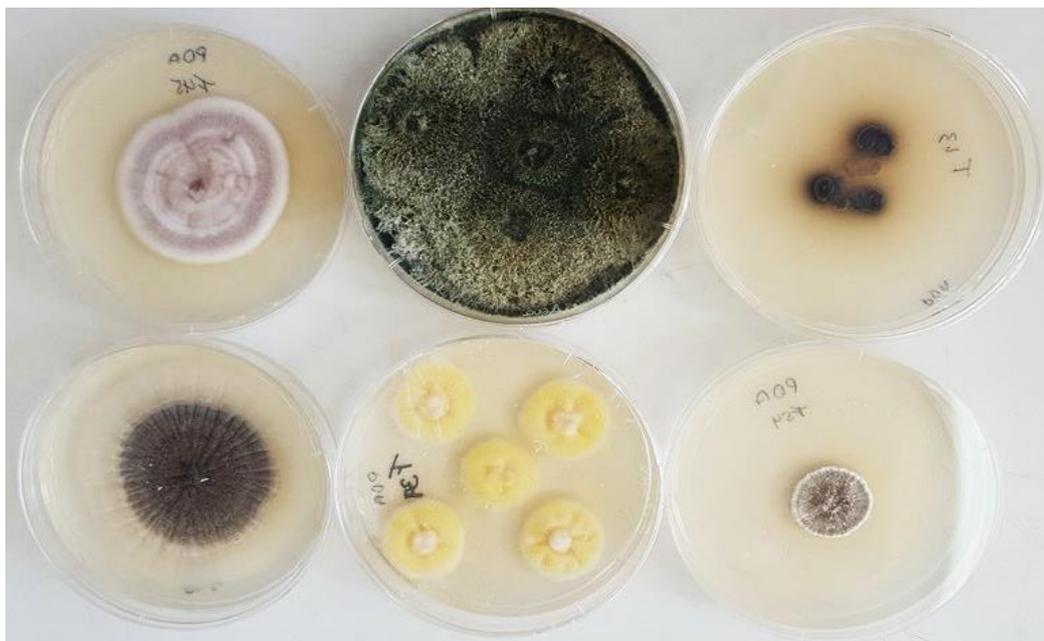
Código	T1	Observación	T2	Observación	T3	Observación
2951	0	Inhibición	0	Inhibición	1	Hongo
2952	0	Inoculo degradado	1	Micelio color alterado	1	Hongo
2953	0	Inoculo alterado	1	Morfología alterada	1	Bacteria
2954	0	Inhibición	1	Colonia decolorada	1	Bacteria
2955	0	Inhibición	1	Micelio degradado	1	Hongo
2956	0	Inhibición	0	Inhibición	1	Bacteria
2957	0	Inhibición	1	Morfología alterada	1	Bacteria
2958	0	Inhibición	1	Acelera esporulación	1	Actinomicete
2959	0	Inhibición	0	Inhibición	0	Hongo
2960	0	Inhibición	1	Crecimiento normal	1	Bacteria
2961	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
2962	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2963	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Actinomicete
2964	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
2965	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Hongo
2966	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Hongo
2967	0	Inhibición	0	Inhibición	0	Actinomicete
2968	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
2969	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete

2970	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2971	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Actinomicete
2972	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
2973	0	Inhibición	0	Inhibición	0	Actinomicete
2974	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2975	0	Inhibición	1	Morfología anormal	1	Bacteria
2976	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2977	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2978	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2979	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2980	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2981	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2982	0	Inhibición	1	Morfología normal	0	Bacteria
2983	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
2984	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2985	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
2986	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
2987	0	Inhibición	0	Inhibición	1	Actinomicete
2988	0	Inhibición	0	Inhibición	1	Bacteria
2989	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2990	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2991	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2992	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
2993	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
2994	1	Sin esporulación	1	Sin esporulación	1	Hongo
2995	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
2996	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
2997	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
2998	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Hongo
2999	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3000	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3001	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Hongo
3002	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3003	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Hongo
3004	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Hongo
3005	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3006	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3007	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3008	0	Inhibición	1	Degradación micelio	1	Hongo
3009	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3010	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3011	0	Inhibición	1	Decoloración micelio	1	Hongo
3012	0	Inhibición	1	Retardo crecimiento	1	Actinomicete
3013	0	Inhibición	1	Esporulación pronta	1	Actinomicete
3014	0	Inhibición	1	Reduce crecimiento	1	Bacteria
3015	0	Inhibición	1	Reduce crecimiento	1	Actinomicete
3016	0	Inhibición	1	Cambio de color	1	Bacteria

3017	0	Inhibición	1	Acelera esporulación	1	Actinomicete
3018	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Actinomicete
3019	0	Inhibición	1	Reduce crecimiento	1	Hongo
3020	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3021	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3022	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3023	0	Inhibición	1	Reduce crecimiento	1	Bacteria
3024	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3025	0	Inhibición	1	Crecimiento lento	0	Actinomicete
3026	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3027	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3028	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3029	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3030	0	Inhibición	1	Acelera esporulación	1	Actinomicete
3031	0	Inhibición	1	Cambio de color	1	Hongo
3032	0	Inhibición	1	Reduce tamaño	1	Bacteria
3033	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3034	0	Inhibición	1	Reduce el tamaño	1	Hongo
3035	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3036	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3037	0	Inhibición	1	Reduce el tamaño	1	Bacteria
3038	0	Inhibición	1	Retraso esporulación	1	Actinomicete
3039	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3040	0	Inhibición	1	Cambio de color	1	Bacteria
3041	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3042	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3043	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3044	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3045						
3046	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3047	0	Inhibición	1	Morfología anormal	1	Bacteria
3048	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3049	0	Inhibición	1	Reducción el tamaño	1	Actinomicete
3050	0	Inhibición	1	Cambio de calor	1	Bacteria
3051	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3052	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3053	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3054	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Actinomicete
3055	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3056	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3057	0	Inhibición	1	Retrasa esporulación	1	Actinomicete
3058	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3059	0	Inhibición	1	Pig. Difusivo alterado	1	Actinomicete
3060	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3061	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3062	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3063	0	Inhibición	1	Morfología anormal	1	Bacteria

3064	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3065	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3066	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3067	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3068	0	Inhibición	1	Degradación	1	Bacteria
3069	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3070	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3071	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3072	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3073	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3074	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Actinomicete
3075	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3076	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Hongo
3077	0	Inhibición	1	Micelio sin color	1	Hongo
3078	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3079	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3080	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3081	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3082	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3083	0	Inhibición	1	Morfología normal	1	Bacteria
3084						

ANEXO M Aislamientos de bacterias, hongos y actinomicetes aislados de las muestras de suelo del sitio en estudio.



Colonias fúngicas comunes en las muestras de suelo



A = bacterias

B = hongo

C = actinomicete

ANEXO N Pruebas bioquímicas de identificación de microorganismos.

1.- Prueba de Oxido/Fermentación

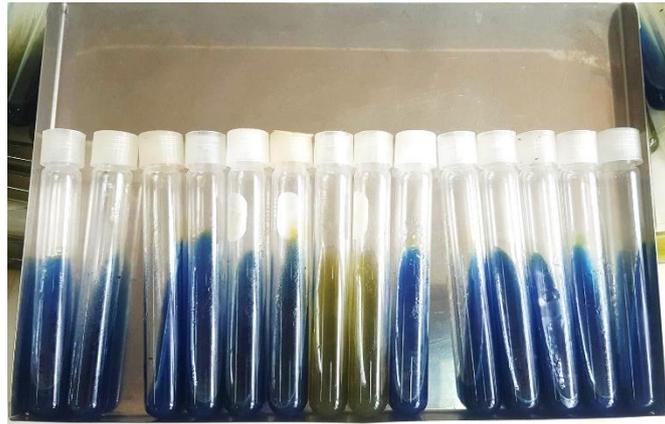


a) DCB 2957 Sólo fermenta (+) amarillo



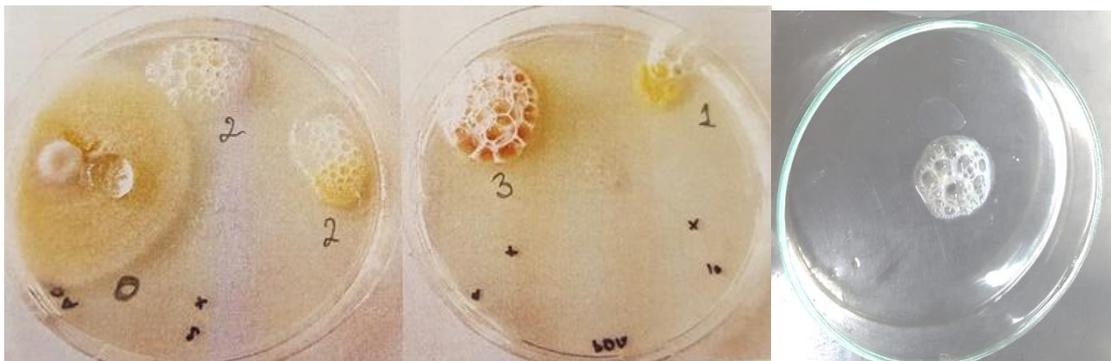
b) DCB 2964 Oxida y fermenta (+) amarillo

2.- Prueba de Utilización de Citrato



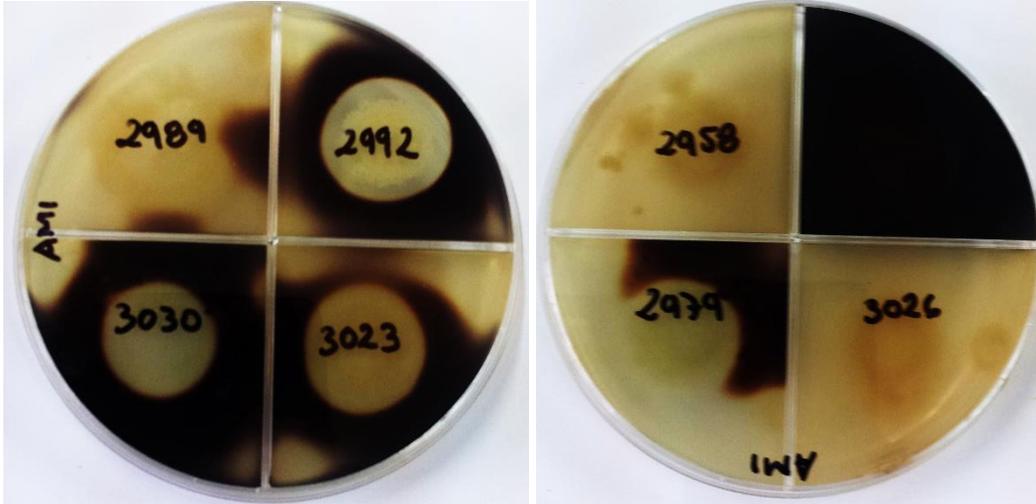
Pruebas positivas (color azul) viraje del indicador, medio alcalino, pruebas negativas (color verde)

3. Prueba enzimática en relación a Oxígeno: Catalasa



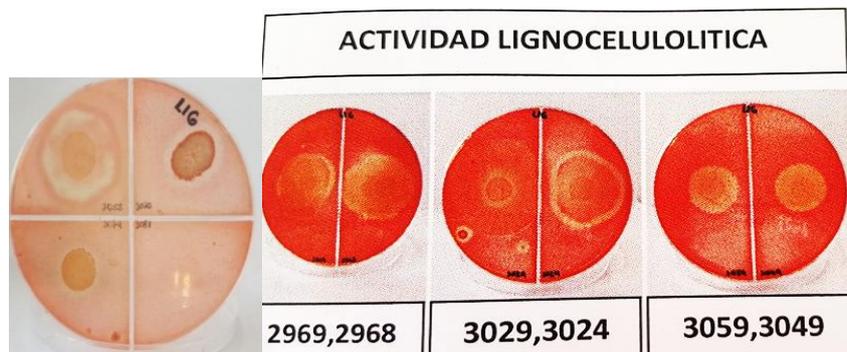
Actividad catalasa (+) burbujeo en las colonias, catalasa (-) sin burbujeo

ANEXO O Actividad enzimática amilolítica: Hidrólisis de Almidón



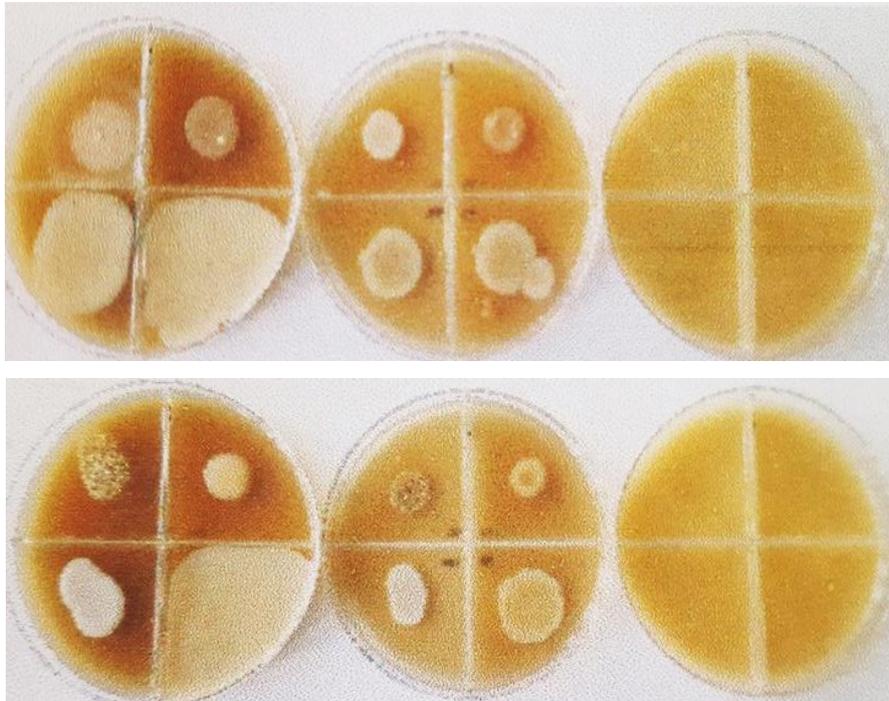
Halos de degradación (hidrólisis de almidón)

Actividad enzimática lignocelulolítica: Halos de degradación de sustancias lignocelulosicas.



Halos de degradación de sustancias lignocelulosicas decoloración del indicador (rojo congo).

ANEXO P Aislamientos de bacterias, hongos y actinomycetes bajo la influencia de Rugby, Tryclan + Sharfip y Control.



T3= control

T2= Rugby

T1= Try+Sha