

	GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS		Código	FO-GS-15
			VERSIÓN	02
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN		FECHA	03/04/2017
			PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ		APROBÓ
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad		Líder de Calidad

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES):

NOMBRE(S): ANDRES DAVID APELLIDOS: DURAN BARRERA

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): LEIDY DIANA APELLIDOS: ARDILA LEAL

CO-DIRECTOR:

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): EVALUACION DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR CLORPIRIFOS AISLADOS DE SUELOS DE CULTIVOS DE ARROZ

RESUMEN

Este trabajo se basó en la evaluación de microorganismos con capacidad de degradar clorpirifos en suelos de cultivos de arroz. Para ello, se aplicó una investigación aplicada tipo experimental, ya que estos análisis se reportaron en estudios respecto a la temática. Se realizaron cuatro tratamientos, correspondientes a dos tratamientos con suelo estéril y no estéril inoculados con *Serratia fonticola* respectivamente y dos tratamientos con suelo estéril y no estéril, donde se evaluó la población microbiana en las horas 0, 24, 48, 192 y 360. Se determinó que los microorganismos son capaces de asimilar (degradar) el clorpirifos y su compuesto de degradación primaria 3, 5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), en un periodo de 48 horas, obteniendo una curva decrecimiento de asimilación y crecimiento de los microorganismos.

PALABRAS CLAVE: *Organofosforado, Pseudomonas plecoglossicida, Serratia fonticola, Aeromonas hydrophila.*

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 118 PLANOS: _____ ILUSTRACIONES: _____ CD ROOM: 1

Copia No Controlada

EVALUACION DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR
CLORPIRIFOS AISLADOS DE SUELOS DE CULTIVOS DE ARROZ

ANDRES DAVID DURAN BARRERA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2017

EVALUACION DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR
CLORPIRIFOS AISLADOS DE SUELOS DE CULTIVOS DE ARROZ

ANDRES DAVID DURAN BARRERA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Ingeniero Biotecnológico

Directora:

M.sc. LEIDY DIANA ARDILA LEAL

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2017

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 02 de MAYO DE 2017

HORA: 02:00 PM

SALA: EDIF. LABORATORIO EMPRESARIAL LE 201

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR CLORPIRIFOS AISLADOS DE SUELOS DE CULTIVOS DE ARROZ"

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADO: LILIAN TRINIDAD RAMIREZ CAICEDO
DIANA MARIA CARDENAS CARO
OSCAR ORLANDO PINILLA MANTILLA

ENTIDAD: UFPS

DIRECTORA: LEIDY DIANA ARDILA LEAL

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
ANDRÉS DAVID DURAN BARRERA	1610678	4.0

OBSERVACIONES: APROBADA

FIRMA DE LOS JURADOS

VoBo Coordinador Comité Curricular _____

Contenido

	pág.
Introducción	13
1. Problema	17
1.1 Título	17
1.2 Planteamiento del Problema	17
1.3 Formulación del Problema	19
1.4 Justificación	19
1.5 Objetivos	20
1.5.1 Objetivo general	20
1.5.2 Objetivos específicos	20
1.6 Alcances y Limitaciones	21
1.6.1 Alcances	21
1.6.2 Limitaciones	21
1.7 Delimitaciones	22
1.7.1 Delimitación espacial	22
1.7.2 Delimitación temporal	22
1.7.3 Delimitación conceptual	22
2. Marco Referencial	24
2.1 Antecedentes	24
2.2 Marco Teórico	27
2.2.1 Biorremediación	27
2.2.2 Compuestos agroquímicos	30
2.2.3 Suelo	36

2.2.3.1 Composición y propiedades del suelo	37
2.2.3.2 Clasificación del suelo	39
2.2.3.3 Propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo	41
2.3 Marco Contextual	50
2.3.1 Historia	50
2.4 Marco Legal	52
3. Diseño Metodológico	53
3.1 Tipo de Investigación	53
3.2 Población y Muestra	53
3.2.1 Población	53
3.2.2 Muestra	53
3.3 Hipótesis	54
3.4 Variables	54
3.4.1 Variables independientes	54
3.4.2 Variables dependientes	55
3.5 Fases de la Investigación	55
3.5.1 Determinación de las características fisicoquímicas del suelo contaminado	55
3.5.1.1 Determinación de la materia orgánica	56
3.5.1.2 pH	57
3.5.1.3 Densidad real	58
3.5.1.4 Densidad aparente	58
3.5.1.5 Porosidad	59
3.5.1.6 Textura	59
3.5.2 Aislamiento y conservación microbiana	60

3.5.3 Selección y caracterización genotípica de las bacterias aisladas en suelos arroceros	62
3.5.3.1 Selección de microorganismos	62
3.5.3.2 Pruebas de tolerancia	62
3.5.3.3 Identificación por el gen DNAr 16S	63
3.5.4 Evaluación de la respuesta de los microorganismos aislados con el mayor índice de tolerancia a clorpirifos bajo condiciones de invernadero	64
3.5.5 Análisis estadístico	67
4. Resultados y Análisis	68
4.1 Caracterización Físicoquímica de las Muestras de Suelo Recolectadas Procedente de Cultivos de Arroz	68
4.2 Aislamiento y Descripción Fenotípica de los Microorganismos Presentes en las Muestras de Suelo de los Cultivos de Arroz	70
4.3 Identificación de los Microorganismos con Potencial para Tolerar Diferentes Concentraciones de Clorpirifos a nivel de Laboratorio	71
4.4 Identificación Molecular de los Microorganismos con Capacidad de usar el Pesticida Clorpirifos como Fuente de Carbono y Energía	75
4.5 Evaluación de la Respuesta de los Microorganismos Seleccionados con Tolerancia al Contaminante bajo un Modelo en Condiciones de Invernadero	77
4.5.1 Análisis estadístico	81
5. Conclusiones	86
Referencias Bibliográficas	87
Anexos	108

Lista de Tablas

	pág.
Tabla 1. Efectos negativos de los plaguicidas	32
Tabla 2. Composición y tamaño de partículas presentes en el suelo	40
Tabla 3. Tipos de texturas de los suelos	42
Tabla 4. Clasificación de porosidad del suelo	48
Tabla 5. Clasificación de los suelos según su pH	49
Tabla 6. Valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos	50
Tabla 7. Variables independientes	54
Tabla 8. Tratamientos para el ensayo de evaluación de microorganismos con potencial para degradar clorpirifos aislados de suelos de fincas de arroz	65
Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos del suelo	68
Tabla 10. Ensayo de microorganismos a diferentes concentraciones de clorpirifos	72
Tabla 11. Aislamientos con la mejor tolerancia al pesticida clorpirifos	75
Tabla 12. Identificación molecular de los microorganismos con mejor tolerancia a clorpirifos	76

Lista de Figuras

	pág.
Figura 1. Perfil general de un suelo. El espesor, presencia y composición de los horizontes varía en función del tipo de suelo y las condiciones climáticas	37
Figura 2. Esquema general de las fracciones que componen un suelo	39
Figura 3. Relación de los constituyentes de tierra fina por tamaño, definiendo las clases texturales y subclases de arena	44
Figura 4. Sistema de color de Munsell	46
Figura 5. Ubicación y toma de las muestras de suelos arroceros A) Ubicación de la toma de muestras de suelos de fincas de cultivo de arroz, Zulia Norte de Santander; B) Recolección de la submuestra de suelo en la ubicación de un punto en el área delimitada	56
Figura 6. Diluciones seriadas decimales para el asilamiento e identificación de los microorganismos presentes en las muestras de suelo de fincas de arroz	61
Figura 7. A) selección de los microorganismos obtenidos de las muestras de suelo de fincas de arroz; B) aislamientos y purificación de un microorganismo obtenido de las muestras de suelo de las fincas de arroz	62
Figura 8. Ensayo a diferentes concentraciones de la tolerancia al pesticida clorpirifos de los microorganismos aislados A) frascos con 20ml de medio mínimo mineral envueltos en aluminio, momentos previos a la aplicación de pesticida; B) montaje del ensayo evaluando algunos aislamientos para determinar la tolerancia al pesticida clorpirifos	63
Figura 9. Evaluación de los microorganismos con el mayor índice de tolerancia al clorpirifos en etapa de invernadero; A y B) Obtención de la biomasa de los aislamientos BBC029, BBC032 y BBC042 seleccionados para hacer el ensayo en invernadero; C y D) Montaje de las unidades experimentales de cada tratamiento para la posterior evaluación de	

los microorganismos frente al clorpirifos en condiciones de invernadero	67
Figura 10. Crecimiento de los aislamientos frente al pesticida clorpirifos en fase de laboratorio A) aislamiento BBC034 capaz de tolerar 50mg/l del clorpirifos; B) Aislamiento BBC034 (izquierda) y aislamiento BBC032 (derecha) evaluados a la concentración 300mg/l de clorpirifos; C) Aislamiento BBC038 capaz de crecer en medio solido nutritivo a una concentración de 1200 mg/l de clorpirifos; D) Asilamiento BBC039 donde obtuvimos poco crecimiento de biomasa a una concentración de 900mg/ de clorpirifos en un periodo de 48 horas	74
Figura 11. Crecimiento general de la población microbiana de los tratamientos con su respectivo control T1 y T5(a), T3 y T6 (b), T2 (c) y T4 y T7 (d), respecto al tiempo	78
Figura 12.Crecimiento general de la población microbiana de los tratamientos T1, T2, T3 y T4 respecto al tiempo	80
Figura 13. Análisis estadístico de los momentos evaluados en el ensayo etapa de invernadero involucrando los tratamientos del ensayos	82

Lista de Anexos

	pág.
Anexo 1. Análisis general de la identificación de microorganismos con potencial degradador de pesticidas	109
Anexo 2. Análisis estadístico	110

Resumen

El presente estudio evaluó la capacidad de degradar compuesto organofosforado (clorpirifos) a partir de aislamientos bacterianos de suelos arroceros de fincas ubicadas en Zulia y Vados (Norte de Santander), se realizó un ensayo a nivel de laboratorio para evaluar la tolerancia a diferentes concentraciones de clorpirifos (50mg/L, 100mg/L, 200mg/L, 300mg/L, 600mg/L y 1200mg/L) y se realizó un ensayo en condiciones de invernadero en respuesta a los microorganismos aislados con el mayor índice de tolerancia a clorpirifos (*Pseudomonas plecoglossicida*, *Serratia fonticola*, *Aeromonas hydrophila*). Se realizaron cuatro tratamientos, correspondientes a dos tratamientos con suelo estéril y no estéril inoculados con *Serratia fonticola* respectivamente y dos tratamientos con suelo esteril y no estéril y no estéril inoculados con un consorcio compuesto por *Pseudomonas plecoglossicida*, *Serratia fonticola*, *Aeromonas hydrophila*) respectivamente, donde se evaluó la población microbiana en las horas 0, 24, 48, 192 y 360. Se determinó que los microorganismos son capaces de asimilar (degradar) el clorpirifos y su compuesto de degradación primaria 3, 5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), en un periodo de 48 horas, obteniendo una curva decrecimiento de asimilación y crecimiento de los microorganismos en el periodo total del ensayo en condiciones de invernadero.

Introducción

En la lucha contra las distintas plagas que amenazan los alimentos y otros productos agrícolas, se suma la emprendida contra los insectos y otros animales, vectores de enfermedades transmisibles. Ambas han adquirido características especiales con el formidable progreso de la industria química en el siglo XX. Este progreso ha suministrado una gran cantidad de sustancias químicas de alta agresividad contra los organismos dañinos pero cuyos efectos sobre el hombre y equilibrio del ecosistema continúan siendo debatidos (Ferrer, 2003).

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 (Paoletti & Pimentel, 2000; Quintero, 2011). Ante esta situación, 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 (Quintero, 2011). Los plaguicidas son productos químicos muy empleados por el hombre para el control de plagas agrícolas y su aplicación correcta es la medida más aceptada y efectiva para lograr la máxima producción y mejor calidad de los cultivos (Bolognesi, 2003; Manssur, 2004). Lo anterior ha propiciado el progreso de la industria de agroquímicos en el siglo XX que a su vez han originado gran cantidad de compuestos de alta agresividad para el hombre y efectos nocivos que han roto el equilibrio del ecosistema.

En mayor o menor grado la población humana está inevitablemente expuesta a los plaguicidas que contribuyen a la contaminación ambiental por medio de productos degradados en aire, suelo, agua y alimentos (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas, 1998; Bolognesi, 2003).

La definición dada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos, otros productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos animales, o que pueden ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en sus organismos.

Según la FAO, 19% (572 000 t) de estas sustancias, lo que equivale a un costo de US\$ 5 700 millones, se utilizan en los países en desarrollo, principalmente para cultivar productos agrícolas de exportación, como el algodón, el banano y el café y Colombia no es la excepción, pues se sabe que en Colombia la industria de plaguicidas se inició hacia el año de 1962, con base en la importación de ingredientes activos y para el año de 1964 se generó la tecnología de la industria hacia la síntesis de algunos ingredientes activos. La síntesis a nivel nacional para la producción de herbicida se inicia en 1985 y para fungicidas en 1995. Este impacto de la industria impulso que para el año 1997 ya se tuviesen registradas 98 empresas dedicadas a la producción y comercialización de plaguicidas que se componía de 300 ingredientes activos con 900 formulaciones comerciales, de las cuales 254 correspondían a insecticidas, 206 a fungicidas, 325 a herbicidas y 133 para otras formulaciones (Ministerio del Medio Ambiente & Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 1998; PNUMA, 2007).

A nivel mundial los principales productores y exportadores de plaguicidas son Alemania, Estados Unidos de América, Inglaterra, Suiza, Francia, Japón e Italia, quienes surten a los países llamados del tercer mundo y que según las agencias de regulación alrededor del 30% de los

plaguicidas comercializados en los países en desarrollo tienen como destino final la agricultura y a la salud pública, con un valor de 900 millones de dólares EUA. Adicionalmente se han encontrado algunos casos en el que los productos no cumplen las normas de calidad aceptadas internacionalmente, conteniendo compuestos o impurezas que han sido restringidos en otros países por su peligrosidad pues constituyen una amenaza para la salud humana y para el ambiente (OMS 1990; Martínez & Gómez, 2007). Sin embargo, es importante resaltar que el impacto negativo sobre el ecosistema por el uso desmedido de dichas sustancias sintéticas ha promovido el desarrollo de metodologías como la biorremediación que permiten la eliminación parcial o total de los contaminantes.

La biorremediación puede emplear organismos autóctonos del sitio contaminado o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo, solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas, conservadores de madera e hidrocarburos aromáticos policíclicos, en procesos aeróbicos y anaeróbicos (Leahy & Colwell 1990; Boopathy, 2004; Rivera & Dendooven, 2004; Lee, Lee, Kim & Kim, 2007; Martínez, Osorio, Pérez, Pinto & Gurrola, 2011).

Las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, aunque también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, Cianobacterias y Actinomicetos para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo (López, Quintero, Guevara, Jaimes, Gutiérrez & García, 2006). Para la biodegradación, el plaguicida podrá servir idealmente como la única fuente de carbón y energía para los microorganismos, incluyendo la síntesis de las enzimas apropiadas para la transformación de este, proporcionando un mecanismo importante en la

degradación de compuestos xenobióticos en el ambiente (Murugesan, Jeyasanthi & Maheswari, 2010, Mendoza, Perea, Salvador, Morales & Pérez, 2011).

Este estudio posibilita el reconocimiento de cepas bacterianas nativas de los suelos cultivados con arroz, que posean la capacidad degradadora de pesticidas organofosforados (clorpirifos), ya que dichos compuestos poseen una dinámica ambiental negativa que buscar ser mitigado especialmente sobre el suelo.

1. Problema

1.1 Título

EVALUACION DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR CLORPIRIFOS EN SUELOS DE CULTIVOS DE ARROZ.

1.2 Planteamiento del Problema

Uno de los mayores problemas que enfrenta el mundo industrializado de hoy es la contaminación de los suelos, aguas subterráneas, sedimentos, aguas superficiales y aire con productos químicos tóxicos y peligrosos. A pesar de que en la actualidad muchos gobiernos han tomado en cuenta esta situación, y han surgido documentos regulatorios para reducir o eliminar la producción y entrada al ambiente de estos reactivos químicos, ya ha ocurrido una severa contaminación en el pasado y seguirá ocurriendo en el futuro (Escobal & Josefina, 2005).

Un suelo se puede degradar al acumularse en él sustancias a unos niveles tales que repercuten negativamente en el comportamiento de los suelos. Las sustancias, a esos niveles de concentración, se vuelven tóxicas para los organismos del suelo. Se trata pues de una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo. Las causas más frecuentes de contaminación son debidas a la actuación antrópica, que al desarrollarse sin la necesaria planificación producen un cambio negativo de las propiedades del suelo (Brissio, 2005).

En los estudios de contaminación, no basta con detectar la presencia de contaminantes sino que se deben definir los máximos niveles admisibles y además se deben analizar posibles factores que puedan influir en la respuesta del suelo a los agentes contaminantes, como son:

vulnerabilidad, poder de amortiguación, movilidad, biodisponibilidad, persistencia y carga crítica, que pueden modificar los denominados "umbrales generales de la toxicidad" para la estimación de los impactos potenciales y la planificación de las actividades permitidas y prohibidas en cada tipo de medio (Brissio, 2005).

El clorpirifos es un plaguicida organofosforado y organoclorado, que desde 1965 ha sido usado ampliamente para el control de insectos, tanto en la agricultura como en el ámbito doméstico. Es muy poco soluble en agua y muy soluble en solventes orgánicos. Clorpirifos es de moderadamente hasta muy persistente en suelos con una vida media de 11 a 210 días, por lo que forma sustancias de degradación más persistentes. Hallazgos toxicológicos y epidemiológicos de asociaciones a neuropatía periférica y a defectos de neurodesarrollo, y la presencia de residuos de clorpirifos o sus metabolitos en el ambiente doméstico y en seres humanos, llevaron a que la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos condujera una re-evaluación de los riesgos asociados a todos los usos aprobados de clorpirifos (Wesseling, Aragón, Rojas, López, Blanco, Soto, et al; 2005).

En Colombia, según los registros estadísticos de la federación nacional de arroceros (Fedearroz) y el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) en el 2014 se reportó 236,557 toneladas de arroz en la zona de Norte de Santander siendo un sistema de producción de alto impacto agrícola en el departamento. La alta producción de este alimento requiere un control eficiente de plagas y enfermedades, haciendo que este cultivo utilice una alta demanda de pesticidas para su aplicación.

Por esta razón es necesario realizar investigación que permita identificar microorganismos con capacidad de utilizar el pesticida clorpirifos como fuente de carbono y energía para mitigar el

impacto ambiental que genera sobre el medio ambiente asociado a los cultivos de arroz, especialmente en las regiones con mayor grado de afectación.

1.3 Formulación del Problema

¿Cuáles microorganismos aislados de suelos arroceros de fincas de Norte de Santander tienen la capacidad de utilizar el pesticida clorpirifos como fuente de carbono y energía?

1.4 Justificación

A medida que crece la población mundial aumenta también la necesidad de mantener la capacidad de producción del suelo. La obtención de la cantidad adecuada de alimentos requiere el uso de plaguicidas para alcanzar y mantener un equilibrio entre las especies vegetales deseadas y sus competidores. Sin embargo, estos compuestos químicos utilizados en agricultura llegan en general al suelo, ya sea directa o indirectamente, y originan problemas de polución y contaminación (Sánchez & Sánchez, 2013).

Las actividades económicas, especialmente la agricultura, están haciendo un uso cada vez más intensivo del suelo, empleando insumos como plaguicidas y fertilizantes, con el fin de obtener alimentos y materias primas para la elaboración de sustancias químicas, como biocombustibles. Igualmente, otras actividades productivas también usan de manera intensiva este recurso, situación que está conduciendo a una degradación creciente del suelo, así como a una pérdida irrecuperable del mismo (Silva & Correa, 2009).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los países desarrollados utilizan el 75 % de los plaguicidas producidos a nivel mundial. Sin embargo, alrededor de dos millones de personas se intoxican anualmente por plaguicidas, en los países subdesarrollados (OPS/OMS,

1986). Con el paso del tiempo las cifras han cambiado, el uso de los pesticidas aumenta en número y frecuencia y su demanda se ha extendido hasta en los países subdesarrollados.

Podemos inferir que estos compuestos se pueden transportar por todos los ambientes comprometiendo a muchos organismos incluyendo a los humanos gracias al contacto de ellos a través de la ingestión o inhalación. El impacto ambiental que producen los pesticidas se debe a la persistencia en los suelos, lixiviación, a los escurrimientos que traslota el compuesto a los cuerpos de aguas superficiales. Si se consideran estos efectos negativos, se hace necesario el desarrollo de métodos efectivos de remediación, donde las tecnologías biológicas ofrecen como ventaja la destrucción parcial o completa de los contaminantes. El papel microbiano en las transformaciones de contaminantes puede ser comprobado ya que el compuesto es transformado a una sustancia menos tóxica para el medio ambiente, demostrando con esto que los microorganismos son capaces de utilizar estos compuestos químicos como nutrientes o energía (Betancur, 2013). Debido a lo anterior, resulta válido impartir análisis para identificar microorganismos que tengan la capacidad para degradar estos contaminantes en función de mitigar el impacto ambiental que generan aumentando la población microbiana en estos suelos contaminados.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general. Identificar la capacidad de tolerancia al pesticida clorpirifos por microorganismos aislados de suelos arroceros.

1.5.2 Objetivos específicos. A continuación se evidencian los objetivos específicos:

- Caracterizar fisicoquímicamente y microbiológicamente a partir de muestras de suelos de

cultivos de arroz establecidos en el municipio del Zulia y los Patios.

- Identificar molecularmente a través del gen 16s DNA ribosomal aquellos aislamientos que presenten la capacidad de tolerar clorpirifos como fuente de carbono y energía.
- Evaluar la respuesta de los microorganismos seleccionados con tolerancia al contaminante bajo un modelo en condiciones de invernadero.

1.6 Alcances y Limitaciones

1.6.1 Alcances. Este proyecto se limita al uso de técnicas de análisis microbiológico, de tipo experimental que me permite identificar los microorganismos que habitan en suelos los cuales se les han aplicado pesticidas para el control de plagas y utilizan estos mismos pesticidas como fuente de alimento para su metabolismo, con el fin de aislarlos y determinar la concentración de pesticidas que pueden tolerar; así como el apoyo de técnicas para el aislamiento y purificación de microorganismos, el uso de espectrofotometría para determinar la viabilidad de los microorganismos y la identificación molecular utilizando métodos de extracción de ADN y el análisis de los fragmentos amplificados. También se incluirá los resultados de los análisis físico-químicos de las muestras de suelos recolectadas para comparación, investigación y discusión de los resultados para efectuar el cumplimiento de los objetivos propuestos.

1.6.2 Limitaciones. Las limitaciones se plantean a continuación:

- Los pesticidas utilizados son comerciales, no son totalmente puros y no están disponibles en el lugar de trabajo.
- Se necesita un permiso previo antes de extraer las muestras de suelo en las fincas de arroz, las cuales se ubican en localidades alejadas.

- Existe un amplio espectro de microorganismos en cada muestra de suelo, haciendo más laboriosa la tarea de purificación de cada microorganismo presente
- Se requiere capacitación para el manejo del espectrofotómetro y otros equipos de laboratorio para evitar riesgos, mejorar los tiempos de análisis y solucionar posibles inconvenientes.
- Se necesita una capacitación para las técnicas de aislamiento de microorganismos, preparación de medios de cultivo y el uso de reactivos para estas tareas.
- Hasta la fecha, en Colombia existe poca información de antecedentes, análisis o cualquier tipo de ensayo con clorpirifos.

1.7 Delimitaciones

1.7.1 Delimitación espacial. Este proyecto de grado modalidad investigación se realizará en la UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER, Sede Central-CÚCUTA (Avenida Gran Colombia No. 12E-96 Barrio Colsag, San José de Cúcuta-Colombia); Laboratorio de Investigación, edificio de Laboratorios Básicos (laboratorio 202-segundo piso). Con excepción de la recolección de muestras, actividad que requiere visitar los municipios de los Patios y Zulia (departamento Norte de Santander).

1.7.2 Delimitación temporal. Se estima que el proyecto puede ser completado en un tiempo no superior a dos semestres. Salvo imprevistos o complicaciones mayores.

1.7.3 Delimitación conceptual. La delimitación conceptual se evidencia de la siguiente manera:

- Análisis fisicoquímico de las muestras de suelo.

- pH.
- Textura.
- Conductividad eléctrica.
- Carbono orgánico.
- Densidad aparente.
- Fosforo.
- Capacidad de intercambio catiónico.
- Potasio.
- Aislamiento de los microorganismos de las muestras de suelo.
- Viabilidad.
- Identificación molecular.

2. Marco Referencial

2.1 Antecedentes

En los últimos años, la mayor parte de los estudios publicados se han referido al tratamiento de terrenos contaminados por pesticidas y compuestos derivados del petróleo, utilizando con éxito la biorremediación (Ryan, Oler & Rucker, 1991; Araujo, Angulo, Cárdenas, Méndez, Morante & Machado, 2004). Esta técnica utiliza la capacidad de los microorganismos para transformar compuestos químicos con la finalidad de disminuir o eliminar su toxicidad, y se ha convertido en una alternativa prometedora para la recuperación de suelos contaminados con estos compuestos (Ryan et al., 1991; Araujo et al., 2004).

Xie, Zhou, Wang & Chen (2008), manifestaron que la cipermetrina afecta la población microbiana. El objetivo fue evaluar las comunidades bacterianas de la filosfera del pepino, los resultados de las aplicaciones de cipermetrina demostraron aumento de la biomasa bacteriana y aumento de la proporción de bacterias gram negativas, lo que indicaba que había altas posibilidades de que esas bacterias estuvieran tomando el contaminante como fuente de carbono y energía. Resultados exitosos han sido encontrados en trabajos realizados con diferentes microorganismos. Grant, Daniell & Betts (2002), realizaron un trabajo de aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de piretroides sintéticos de uso veterinario en muestras de suelo, concluyendo que existe un fuerte potencial de bacterias como mecanismo biorremediador para el tratamiento de estos residuos.

Se ha reportado la biodegradación completa de clorpirifos por la cepa *Paracoccus sp* Li, Wang, Shi, Qu, Zhai & Xu (2011) y además mediante la bacteria *Enterobacter* B-14 usada en biorremediación de suelos contaminados (Singh, Walker, Morgan & Wright, 2004). Mallick,

Bharati, Banerji, Shakil & Sethunathan (1999), demostraron la degradación de clorpirifos en medio de sales minerales por algunas especies de *Arthrobacter*. Algunos hongos del suelo como son *Trichoderma viridae* y *Aspergillus niger* han degradado este compuesto (Mukherjee & Gopal, 1996), así como por el hongo *Verticillium sp.* (Hua, Yue, Yi, Xiao, Xue & Pana, 2008). El empleo de la microalga *Chlorella vulgaris* ha mostrado eficacia en la desintoxicación de este pesticida (Mukherjee et al. 2004), y recientemente se ha evaluado la cianobacteria *Spirulina platensis* con gran eficiencia de remoción (Thengodkar & Sivakami, 2010).

Betancur (2013), Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: caso DDT. El 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDT) ha sido usado desde la segunda guerra mundial para controlar enfermedades transmitidas por insectos en humanos y animales domésticos. La biorremediación involucra el uso de microorganismos para degradar contaminantes orgánicos presentes en el ambiente, transformándolos en compuestos más simples y de menor peligrosidad, inclusive inocuos. Esta estrategia de descontaminación tiene bajos costos, una amplia aceptación pública y puede llevarse a cabo en el sitio. La biodisponibilidad de los contaminantes puede ser mejorada, tratando los suelos en presencia de agentes movilizadores del contaminante como los surfactantes. En esta revisión se discuten las diferentes estrategias de biorremediación de suelo contaminado con DDT, incluyendo mecanismos y rutas de degradación. Se describe la aplicación de estas técnicas en suelo contaminado y se discute cuál es la mejor estrategia para remediación de DDT.

Marín & Jaramillo (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. El incremento en el uso de pesticidas organofosforados en las prácticas agrícolas a través de los últimos años, ha generado una serie de problemas ambientales. Estos compuestos tienden a bioacumularse a través de las cadenas

tróficas presentando altos niveles de toxicidad desencadenando potenciales riesgos para la salud de las especies que son expuestas a este tipo de sustancias. En esta investigación se usaron los métodos de extracción soxhlet y micro extracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME) para la extracción de pesticidas organofosforados en suelos de cultivo y leche de ganado bovino, respectivamente. Se determinó la presencia de demeton-S-metilsulfón en concentraciones entre 272.9 y 1793.3 ppm en los suelos de cultivo y 12.9 ppm en leche de vaca. Se aislaron bacterias nativas de suelo con capacidad degradadora de estos pesticidas, *Bacillus* sp y *Pantoea agglomerans*, obteniéndose resultados de degradación del compuesto organofosforado, clorpirifos de 73.5% y 68.67%, respectivamente, evidenciando que estos microorganismos son una posible solución para el mejoramiento de suelos contaminados por esta clase de pesticidas.

Mendoza et al. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. Fue estudiada la biodegradación de permetrina y cipermetrina a concentraciones de 50 y 100 mg/L, con cepas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*, en reactores por lotes. Las cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* fueron las que presentaron una mayor capacidad de biodegradación de los plaguicidas, a partir de los 5 días esta es del 65% para ambos plaguicidas y después de los 15 días se mantiene prácticamente constante, siendo de hasta el 95% para permetrina a 50 y 100 mg/L y para cipermetrina del 90% a 50 mg/L y 89% a 100 mg/L medido mediante espectrofotometría UV/Vis. La cinética de crecimiento y los espectros de infrarrojo muestran que hay una mayor capacidad de mineralización para el plaguicida permetrina que para la cipermetrina. Estos resultados indican que estas bacterias pueden ser usadas en procesos de biorremediación de estos plaguicidas.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Biorremediación. Es un proceso que consiste en la aplicación de tratamientos biológicos para la limpieza de áreas contaminadas con químicos peligrosos, se requiere el control y manipulación de procesos microbianos. Esta es una posible solución a los problemas antes mencionados, se puede lograr mediante la bioestimulación de microorganismos nativos del suelo, donde existen bacterias, hongos y actinomicetos los cuales por adaptación, inducción y cometabolismo desarrollan una capacidad potencial para degradar y/o mineralizar compuestos recalcitrantes en aguas residuales industriales, desechos de refinerías, combustibles, o derrames en tanques de almacenaje, aplicable también a desechos químicos orgánicos, organohalogenados y metales pesados. La biorremediación baja los costos en comparación con otras tecnologías (Leahy & Colwell, 1990; Roane, Josephson & Pepper, 2001).

Biorremediación de suelos: Las tecnologías de biorremediación de suelos contaminados fueron desarrolladas para acelerar el proceso natural de la recuperación de suelos. Este efecto es logrado mediante la optimización de la capacidad natural de microorganismos para degradar un contaminante, proporcionando las condiciones esenciales para el crecimiento y la biodisponibilidad del contaminante, así como la reducción del estrés abiótico sobre la microflora (Vidali, 2001).

Se han empleado diferentes criterios a la hora de clasificar las estrategias de biorremediación de suelos contaminados. Si la eliminación de los contaminantes implica el uso de los microorganismos presente en el sitio de la contaminación (endógena), la biorremediación se considera como un sistema de tratamiento natural en el cual la acción del hombre se limita a estimular la acción de estos agentes mediante la adición de determinados nutrientes o aire. La

estrategia más básica de biorremediación natural consiste en permitir que la microflora autóctona actúe sobre el contaminante sin ninguna intervención (Vidali, 2001).

Las tecnologías de biorremediación de suelos contaminados fueron desarrolladas para acelerar el proceso natural de la recuperación de suelos. Este efecto es logrado mediante la optimización de la capacidad natural de microorganismos para degradar un contaminante, proporcionando las condiciones esenciales para el crecimiento y la biodisponibilidad del contaminante, así como la reducción del estrés abiótico sobre la microflora (Vidali, 2001).

Por otro lado, si se determina que la microflora autóctona del suelo no es suficientemente activa para degradar los contaminantes presentes, se hace necesario inocular microorganismos especializados en degradar el tipo de contaminante específico (microflora exógena) (Gentry, Rensing & Pepper, 2004; Domde, Kapley & Purohit, 2007). Las tecnologías de biorremediación se han desarrollado para ser aplicadas *in situ* o *ex situ*, según la necesidad de mantener condiciones ambientales apropiadas para conseguir altas tasas de biodegradación de los contaminantes.

En función de la estrategia empleada se describen a continuación las principales tecnologías de biorremediación de suelos.

Biorremediación *in situ*: Estas técnicas son generalmente las opciones más utilizadas, debido al bajo costo y a la poca intervención del suelo, ya que el tratamiento se realiza en el lugar, se evita la excavación y el transporte de contaminantes. Sin embargo, el tratamiento *in situ* es limitado por la profundidad del suelo. El oxígeno es uno de los factores de mayor importancia y que limita la eficacia del Biorremediación de suelos contaminados por hongos de pudrición blanca proceso sólo a unos cuantos centímetros en la superficie del suelo. Los tratamientos más

importantes son (Vidali, 2001):

Bioventilación o inyección de aire: Este consiste en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección a presión de oxígeno en la zona edáfica no saturada mediante pozos de inyección. En estudios realizados para la remediación de suelos contaminados con tricloroetileno mediante esta técnica demostró una elevada degradación del contaminante (95%) (Sui, Li, Huang & Jiang, 2006).

Biosparging: Es un método in situ que combina el efecto de la ventilación con la utilización de microorganismos autóctonos para degradar compuestos orgánicos adsorbidos por el suelo en la zona saturada. Esta técnica se utiliza para la limpieza de los compuestos orgánicos en suelos y agua subterránea (Bass, Hastings & Brown, 2000).

Biorremediación ex situ: Esta alternativa es más rápida, fácil de controlar y ha sido empleada con éxito para tratar un amplio rango de contaminantes en diferentes tipos de suelos. Sin embargo, es necesaria la excavación y el tratamiento del suelo antes y algunas veces después de la etapa de biorremediación, por lo que presenta costos de operación superiores a los sistemas de biorremediación in situ.

Laboreo del suelo (landfarming): Es una técnica simple en la cual el suelo contaminado es excavado y extendido sobre una membrana impermeable. Posteriormente, el suelo es removido periódicamente hasta que se degradan los agentes contaminantes (Straube, Nestler, Hansen, Ingleberg, Pritchard & Jones, 2003).

Compostaje: Es una técnica que involucra la mezcla del suelo contaminado con residuos orgánicos, tales como abono y residuos agrícolas. La presencia de estos materiales orgánicos

permite el desarrollo de una población microbiana y de una temperatura elevada (Jiang, Zeng, Huang, Chen, Liu, Huang et al., 2006).

Biopilas: Es una mezcla entre la técnica laboreo de suelo y compostaje. Consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables, formadas por suelo contaminado y materia orgánica (compost) en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes.

2.2.2 Compuestos agroquímicos. Los xenobióticos son sustancias que no existen de manera natural sino que son sintetizadas por el hombre, e introducidas por actividades humanas y su uso se ha incrementado en las últimas décadas de forma considerable causando un grave daño al ambiente. Un ejemplo de este tipo de sustancias son los plaguicidas los cuales son ampliamente utilizados con el fin de realizar control químico de plagas que atacan los cultivos.

Un plaguicida se define como una sustancia o mezcla en cualquier estado físico cuya finalidad sea la de controlar, combatir y/o prevenir plagas o enfermedades y en general tienen el objetivo de proteger al hombre de organismos que afectan su ambiente, animales y/o alimentos. Esta definición incluye los materiales agrícolas de consumo, madera y sus derivados, forraje para animales o productos que puedan administrárseles para el control de insectos, arácnidos y/o diferentes plagas (Gilden, Huffling & Sattler, 2010).

La historia de los plaguicidas se puede resumir y dividir en tres grandes etapas: la primera a principios del siglo XIX, cuando se descubrió accidentalmente la acción plaguicida de algunos elementos naturales como el azufre, cobre, arsénico, piretrinas (sustancias obtenidas de los pétalos del crisantemo *Chrysanthemum cinerariifolium*). y fósforo; así mismo se inició el uso de los derivados del petróleo. La segunda etapa en 1922, cuando se emplearon diferentes aceites

insecticidas y poco más tarde los primeros productos sintéticos. La tercera etapa, en la que Müller, en 1940 descubre las propiedades insecticidas del dicloro-difenil-tricloroetano, mejor conocido como DDT. A partir de esa fecha ese nuevo compuesto se utilizó para la eliminación de algunos parásitos como el piojo que transmitían enfermedades como el tifo; es así como se origina la industria de los plaguicidas organosintéticos (FAO, 2011).

Desde entonces se han producido potentes venenos contra los diferentes organismos plaga, siendo la mayoría organoclorados y su principal característica es que poseen átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones, oxígeno; siendo muy estables en el ambiente. Además están los organofosforados derivados del ácido fosfórico. Estos poseen un átomo central de fósforo en la molécula, son muy tóxicos y menos estables en el ambiente en relación con los organoclorados (Cremllyn, 1979).

Aunque es reconocible que el uso de plaguicidas ha generado beneficios en la producción agrícola a nivel mundial, el empleo inadecuado de los mismos expresado en términos de tipo de plaguicida, toxicidad, número de aplicaciones y sobredosificación ha producido diferentes formas de contaminación ambiental que afectan el suelo, agua, aire y los mismo productos agrícolas por acumulación de residuos (Conant, 2005). Investigaciones señalan que los compuestos sintéticos más usados son los plaguicidas, que en muchos casos resultan ser muy tóxicos (Galli, 2002). Estudios demuestran que el 80% de las ventas globales de plaguicidas se consume en los países desarrollados, mientras que en los subdesarrollados se consume el 20% restante (Papale, 2003).

La agricultura hace un uso cada vez más intensivo del suelo, empleando insumos como plaguicidas con el fin de obtener alimentos y materias primas. El suelo es un componente esencial del ambiente en el que se desarrolla la vida; es vulnerable, de difícil y larga

recuperación, y de extensión limitada, por lo que se considera un recurso natural no renovable (Silva & Correa, 2009); a pesar de ello los pesticidas constituyen una estrategia de control de enfermedades y plagas de los cultivos y han contribuido significativamente en el mantenimiento y en los rendimientos de producción (Anuja, 2005), mejorando a nivel mundial y en los países en desarrollo la situación alimentaria.

Los sistemas de producción agrícola convencionales han producido serio impactos negativos al ambiente concluyendo en problemas crecientes de contaminación, destacándose la reducción de la actividad microbiana del suelo, la pérdida de biomasa, muerte de plantas sensibles a estas sustancias, afectaciones en la salud de la población, pérdida de la fertilidad natural de los suelos y su erosión, así como contaminación de los productos destinados al consumo, destrucción de los controladores naturales y la generación de resistencia de plagas; mediante el uso intensivo de productos químicos que si bien son simples de usar y efectivos finalmente producen contaminación ambiental (Pacheco, 2006; Silva & Correa 2009).

Tabla 1. Efectos negativos de los plaguicidas

Tipo de Pesticida	Localización	Efecto
Herbicidas		
Ácidos aromáticos	Suelos	Una sobrecarga de residuos afecta las cosechas posteriores
	Aguas	Elimina o inhibe la acción de algunas plantas acuáticas
Aminas, anilinas, nitrilos, ésteres, Carbamatos	Suelos	Su persistencia puede afectar cosechas posteriores
	Aguas	Es extremadamente tóxico para peces. Su uso en suelos arenosos y nivel freático elevado provoca serios problemas de contaminación de aguas subterráneas
Insecticidas		
Organoclorados	Suelos	Los residuos afectan las cosechas posteriores, el transporte por las aguas superficiales afecta las plantas acuáticas
	Aguas	Las aguas contaminadas pueden afectar las plantas, altamente toxico en camarones y afecta la reproducción de los peces.
Organofosforados y piretroides	Suelos	Tienen corta vida media, por lo que sus efectos sobre las plantas es escaso
	Aguas	Tóxicos para peces, ciertas algas y algunos anfibios.

Fuente: Linares (2007).

Clorpirifos: El clorpirifos (O,O - dietil O - 3, 5, 6 - tricloro - 2 - piridil fosforotioato), es un pesticida de amplio espectro conocido en el comercio con los nombres de Dursban, Lorsban y Spannit, el cual tiene actividad insecticida contra una amplia gama de insectos y plagas de artrópodos. Comercialmente es un sólido blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte. No es muy soluble en agua, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de aplicarse a cosechas o a animales. El clorpirifos se ha usado ampliamente en viviendas y en agricultura. En el hogar, se usa para controlar cucarachas, pulgas, y termitas; también se usa en ciertos collares de animales domésticos para controlar pulgas y garrapatas. En agricultura, se usa para controlar garrapatas en ganado y en forma de rocío para el control de todo tipo de plagas de cosechas (Gray, 1965).

El clorpirifos entra al medio ambiente a través de la aplicación directa a cosechas, prados, y viviendas. También puede entrar al medio ambiente a través de la volatilización, derrames y disposición de residuos de clorpirifos. Existen diferentes maneras de exposición al clorpirifos: Usándolo para controlar plagas caseras como termitas, pulgas o cucarachas; respirando aire en el interior de viviendas u otros edificios donde se ha aplicado el compuesto alrededor de los cimientos para controlar termitas. Respirando aire en un área donde se roció clorpirifos sobre cosechas o al tocar la tierra cultivada o al poner alimentos u otros artículos contaminados en la boca (Environmental Protection Agency, 2010).

Los mecanismos por los cuales puede llegar a afectar la salud son diversos: Al respirar aire en un área donde se roció clorpirifos recientemente, puede producir una variedad de efectos sobre el sistema nervioso, incluyendo dolores de cabeza, visión borrosa, lagrimeo, excesiva salivación, secreción nasal, mareo, confusión, debilidad o temblores musculares, náusea, diarrea y cambios bruscos en el latido del corazón. El efecto depende de la cantidad de clorpirifos en el aire y de la

duración de la exposición. La EPA solicita la notificación de derrames o liberaciones accidentales al medio ambiente de 1 libra o más de clorpirifos. La EPA también recomienda que los niños no tomen agua con niveles de clorpirifos mayores de 0.03 miligramos por litro de agua (0.03 mg/L) por períodos de 1-10 días. La Administración de Alimentos y Drogas (FDA) ha establecido límites de tolerancia para el clorpirifos en productos agrícolas de 0.05 a 15 partes de clorpirifos por millón de partes de alimento (0.05-15 ppm) (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 1997).

Como se ha descrito, los insecticidas como el clorpirifos, representan un instrumento imprescindible en la agricultura para el control de plagas, por lo que no resulta una tarea sencilla prohibir su uso. Es por este motivo que se debe pensar en alternativas para detener, aminorar o remediar la grave contaminación producida por este producto y, una opción ambientalmente limpia y viable es el empleo de la biorremediación.

Degradación de Plaguicidas por microorganismos: Dentro de los plaguicidas se encuentran los ácidos clorofenoxialquil carboxílicos, ureas sustituidas, nitrofenoles, triacinas, fenilcarbamato, organoclorados, organofosforados. Algunas de estas sustancias pueden actuar como donadores de electrones o como fuente de carbono para ciertos microorganismos. Estos compuestos tienen diferencias en la persistencia en el ambiente pero esa persistencia es aproximada dado que depende de varios factores ambientales como la temperatura, el pH, la aireación y el contenido de sustancias orgánicas del suelo. Algunos de los insecticidas pueden persistir por más de 10 años en el suelo. La degradación de los compuestos xenobióticos mediante el empleo de microorganismos es una alternativa ambientalmente favorable. Los microbios en algunos casos utilizan los contaminantes como un sustrato del cual obtienen energía o fuente de carbono para su desarrollo. Las vías metabólicas son muy variadas como la fermentación,

respiración anoxigénica, acción de exoenzimas y procesos quimiolitótrofos (Matsumura, 1982). Las reacciones catabólicas ocurren principalmente cuando las dosis de pesticidas son altas y la estructura química permite su degradación. Existen una serie de reacciones que pueden ser realizadas por microorganismos heterótrofos sobre los plaguicidas:

Detoxificación- Conversión de una molécula tóxica en otra no tóxica (*Arthrobacter* spp).

Degradación- Transformación de una sustancia compleja en productos más simples ej. la mineralización que da como resultado la aparición de CO₂, H₂O, NH₃, etc (*Pseudomonas* spp).

Conjugación- Formación de compuestos por reacciones de adición, en donde el microorganismo combina el plaguicida con metabolitos celulares (adición de aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.).

Técnicas de Biología Molecular: En algunos casos, los metabolitos producidos a partir de reacciones iniciales de degradación de un compuesto químico contaminante son aún tóxicos o resistentes a la degradación. Un posible enfoque para mejorar estos procesos de degradación es el aprovechamiento de consorcios de microorganismos con las rutas de degradación requeridas (Singh, Hyun Kang, Mulchandani, & Chen, 2008).

La comprensión de la fisiología y genética de las poblaciones involucradas en los procesos de biorremediación es útil para evaluar y mejorar la descontaminación (Watanabe, 2001). Aunque los microorganismos juegan un papel esencial en los ciclos biogeoquímicos y en el proceso de biorremediación, la identificación de cepas y el conocimiento de los cambios en las comunidades microbianas durante la biorremediación es escaso, debido a que muchas de las bacterias ambientales no pueden todavía ser cultivadas por técnicas convencionales de laboratorio, esto

dificulta la valuación del impacto de la biorremediación en el ecosistema (Iwamoto & Nasu, 2001). El avance en los métodos de biología molecular ha facilitado el estudio de determinación de las estructuras de las comunidades microbianas involucradas en los procesos de biorremediación sin llevar a cabo su cultivo en muchas ocasiones el crecimiento microbiano en un ambiente sintético.

2.2.3 Suelo. El suelo puede definirse, de acuerdo con el glosario de la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo, como el material mineral no consolidado en la superficie de la tierra, que ha estado sometido a la influencia de factores genéticos y ambientales (material parental, clima, macro y microorganismos y topografía), actuando durante un determinado periodo (Instituto Nacional de Ecología, 2004). Sin embargo, otros autores consideran al suelo como un cuerpo natural que está involucrado en interacciones dinámicas con la atmosfera y con los estratos que están debajo de él, estratos que son llamados horizontes del suelo (ver figura 1), los cuales son:

- Horizonte O. Estrato superficial, detritos orgánicos, hojas, materia orgánica parcialmente descompuesta.
- Horizonte A. Suelo superficial, materia orgánica parcialmente descompuesta (humus), raíces, organismos vivos y minerales.
- Horizonte E. Zona de lavado, también conocida como infiltración. Capa mineral que presenta lixiviación de minerales, arcilla y cationes, además de acumulación de partículas de arena y limo.
- Horizonte B. Subsuelo o zona de acumulación, capa mineral donde se acumulan arcillas, óxidos de hierro y aluminio, compuestos húmicos y los cationes lixiviados del horizonte A.

- Horizonte C. Material parental, parcialmente descompuesto, zona poco afectada por procesos pedogenéticos, compuesta por sedimentos y fragmentos de roca. Presenta acumulación de sílice, carbonatos y yeso.
- Horizonte R. Material parental, siendo una capa compuesta por rocas y por lo tanto difícil de penetrar, excepto por fracturas.

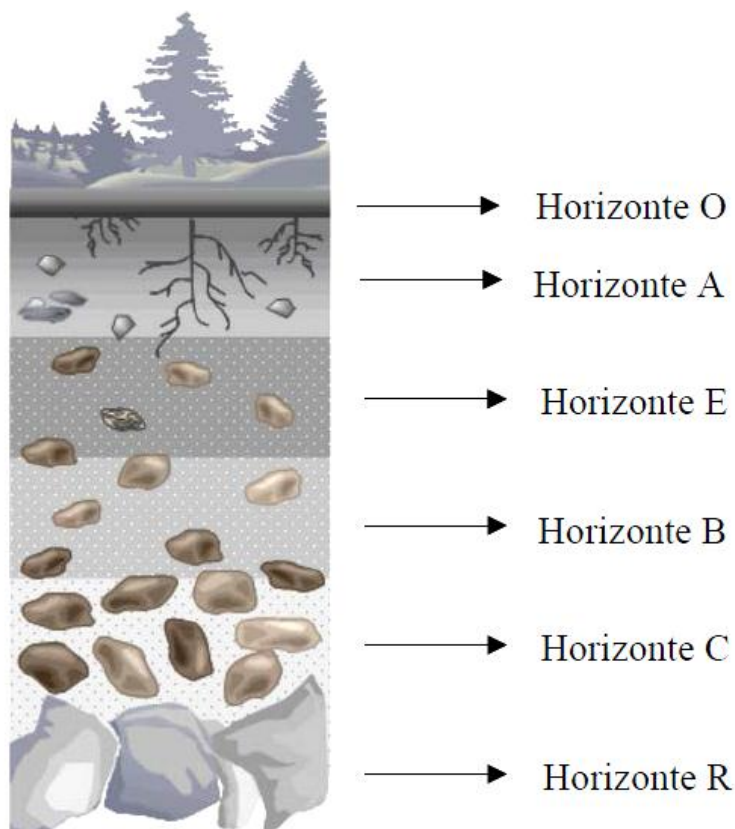


Figura 1. Perfil general de un suelo. El espesor, presencia y composición de los horizontes varía en función del tipo de suelo y las condiciones climáticas

Fuente: Volke, Velasco & De la Rosa (2005).

2.2.3.1 Composición y propiedades del suelo. El suelo se constituye como un recurso de gran importancia, puesto que es hábitat de organismos, así como como una matriz e infraestructura y fuentes de materiales no renovables. En ese sentido tenemos;

Reactor natural. El suelo es un elemento filtrante, amortiguador y transformador, que regula los ciclos del agua y los biogeoquímicos. Tiene la propiedad de retener sustancias mecánicamente o fijarlas por adsorción. Además promueve fenómenos de evotranspiración o transpiración del aire a través de la superficie (Volke et al., 2005).

Hábitat de organismos y reserva genética. El suelo constituye, junto con el agua, el aire y la luz solar, el fundamento de la vida en los ecosistemas terrestres, alberga gran variedad de microorganismos y organismos (Volke et al., 2005), entre los primeros mencionamos a bacterias, hongos, levaduras y nematodos.

Soporte físico de infraestructura. Por sus características físicas, químicas y mecánicas, el suelo posee propiedades de soporte para el desarrollo de actividades forestales, recreativas y agropecuarias, además de socioeconómicas como vivienda, industria y carreteras, entre otras (Volke et al., 2005).

Fuente de materiales no renovables. El suelo es un yacimiento de materias primas, como minerales no metálicos de interés para la construcción (piedra, mármol, caliza, yeso, arena) y combustibles fósiles como el petróleo, entre otros (Volke et al., 2005).

El suelo es una mezcla compleja de materiales inorgánicos (fracción mineral, formada esencialmente por arcillas, limo y arenas), materia orgánica, agua/aire y organismos vivos (ver figura 2).

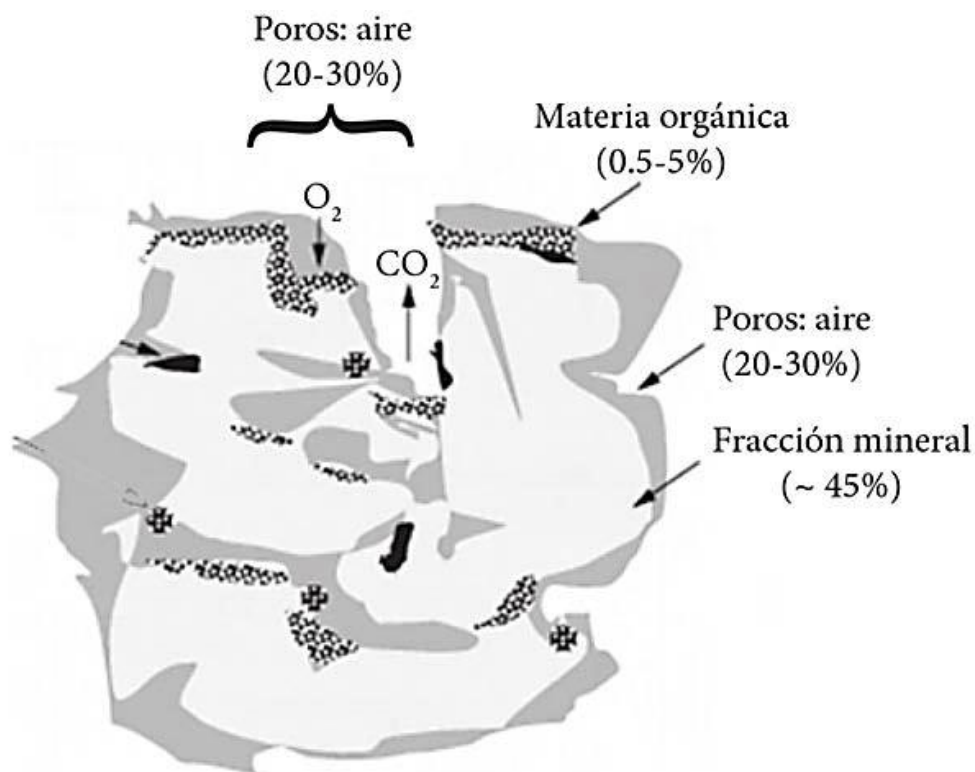


Figura 2. Esquema general de las fracciones que componen un suelo

Fuente: Volke et al. (2005).

2.2.3.2 Clasificación del suelo. La clasificación de los suelos es una temática amplia, que va en función de sus propiedades y usos, en ese orden de ideas consideramos:

La clasificación en función a su tamaño de partículas, comprendidas entre arcilla, limo, arena grava (Tabla 2), de tal forma que podemos describir suelos arcillosos, limosos y arenosos y las diferentes proporciones y/o combinaciones de estas. Las cantidades relativas de cada tipo de partícula mineral determinan la textura de un suelo y tienen impacto directo sobre sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Van, Lloyd, Chetry, Liou & Peck, 2002).

Tabla 2. Composición y tamaño de partículas presentes en el suelo

Componente	Tamaño de la partícula (mm)
Arcilla	<0,002
Limo	0,002 – 0,05
Arena	0,05 – 2
Grava	>2

Fuente: Volke et al. (2005).

Por otro lado, el sistema FAO/UNESCO/ISRIC de 1998 planteó una clasificación internacional de los suelos, dividiéndolos en unidades o categorías de acuerdo a ciertas características generales, como su morfología y composición, con énfasis en las propiedades que se pueden ver, sentir o medir (profundidad, color, textura, composición química entre otros) así como las características de los horizontes, junto con el grosor, número y naturaleza de las capas (Instituto Nacional de Ecología, 2007), en ese orden de ideas se tiene:

- Entisol. Casi nula diferenciación de horizontes, distinciones no climáticas: aluviones, suelos helados y desiertos de arena.
- Vertisol. Suelos ricos en arcilla, generalmente en zonas subhúmedas a áridas, con hidratación y expansión en húmedo y agrietados cuando secos.
- Inceptisol. Suelos con débil desarrollo de horizontes, suelos de tundra, volcánicos recientes, zonas recientemente desglaciadas.
- Aridisol. Suelos secos, climas áridos, sales, yeso o acumulaciones de carbonatos frecuentes.
- Mollisol. Suelos de zonas de praderas en climas templados, horizonte superficial, blando, rico en materia orgánica, espesas y oscuras.

- Spodosol. Suelos forestales húmedos, frecuentemente bajo coníferas, con un horizonte B enriquecido en hierro y/o en materia orgánica y comúnmente un horizonte A gris-ceniza.
- Ultisol. Suelo de zonas húmedas templadas a tropicales sobre antiguas superficies intensamente meteorizadas, suelos enriquecidos en arcilla.
- Oxisol. Suelos tropicales y subtropicales, intensamente meteorizados formándose recientemente horizontes lateríticos y suelos bauxíticos.
- Histosol. Suelos orgánicos, turba, lignito, sin distinciones climáticas.

2.2.3.3 Propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo. Las propiedades fisicoquímicas del suelo son las características que éste expone en un ambiente determinado, es decir, son aquellas propiedades que caracterizan a los suelos. Huerta (2010), menciona que ejemplo de lo mencionado anteriormente propuesto por Volke et al. (2005), sería la composición química y la estructura física del suelo están determinadas por el tipo de material geológico del que se origina, por la cubierta vegetal, por el tiempo en que ha actuado el interperismo, por la topografía y por los cambios artificiales resultantes de las actividades humanas a través del tiempo. Entre sus propiedades podemos describir;

Textura:

La textura de un suelo está determinada por las cantidades de partículas minerales inorgánicas de diferentes tamaños (tabla 4) que contiene (Huerta, 2010). La textura es una propiedad importante, ya que influye como factor de fertilidad y en la habilidad de retener agua, aireación, drenaje, contenido de materia orgánica y otras propiedades. Como se mencionó anteriormente, unos de los tipos de partículas presentes en el suelo es la arena, son relativamente grande de tamaño (0,05 – 2 mm) y, por lo tanto, expone una superficie pequeña comparada con la expuesta

por un peso igual de partículas de arcilla o limo. Las arenas aumentan el tamaño de los poros entre las partículas, facilitando el movimiento del aire y del agua del drenaje (Huerta, 2010). El tamaño de la partícula de los limos va de 0,002 – 0,05 mm, los cambios ambientales (temperatura, luz, viento) que pueda presentar éste tipo de partícula son más rápidos, presentan una liberación de nutrientes solubles para el crecimiento vegetal mayor que la arena. Este tipo de partículas permite que los suelos puedan retener mayor cantidad de agua, la cual es usada para el crecimiento vegetal. Son partículas suaves al tacto, que no permiten adherencia a otras partículas (Piña, 2012). El tamaño de partícula de los suelos arcillosos es menor a 0,002 mm, estos suelos tienen la capacidad de retener agua, El componente arcilloso de un suelo es fundamental para determinar muchas características de los mismos, debido a que las partículas de arcilla tienen un área superficial mayor. Los suelos arcillosos presentan desventajas, una de estas es que tienen cargas eléctricas negativas y permiten retener cationes como potasio (K⁺) y magnesio (Mg) los cuales son esenciales para el crecimiento vegetal, no permiten la movilización de nutrientes en fase acuosa.

La clasificación de los suelos es muy extensa, dependiendo de la interacción de las partículas en el suelo, en ese sentido se puede ser:

Tabla 3. Tipos de texturas de los suelos

Textura	Características
Arena	Son partículas sueltas de granos simples
Limoso	Suelo suave al tacto, no se adhiere a los dedos
Arcillosa	Suelo con textura plástica y adhesiva.
Franco	Suelo que presenta una buena textura, tiene proporciones adecuadas de arena, limo y arcilla que da al suelo una excelente condición para la agricultura.
Franco Limoso	Tiene mayor consistencia, es más suave entre los dedos.
Franco arcillo-arenoso	La diferencia entre estas dos texturas es que la primera es más áspera al tacto y adhiere moderadamente a los dedos, mientras que la segunda es suave y no

Textura	Características
Franco arcillo- limoso	se adhiere a los dedos
Franco arcilloso	Esta textura tiene bastante arcilla, lo que lo hace bastante coherente y compacto.
Arcillo arenoso Arcillo limoso	La diferencia entre estas dos texturas es que la primera es más áspera y se sienten los gránulos de arena, mientras que la segunda es más suave y se adhiere poco a los dedos.
Arenoso franco	Es un suelo que tiene bastante arena pero tiene la suficiente cantidad de arcilla y limo para hacerlo ligeramente coherente y compacto
Arenoso franco	La proporción de arcilla y limo aumenta lo que le da mucha más cohesión que la textura anterior.

Fuente: Piña (2012).

La organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación (FAO) propuso en su guía para la descripción de suelos un esquema (triángulo) para la clasificación de la textura de un suelo (ver figura 3), en este se muestra la relación entre las clases textuales básicas y los porcentajes de arcilla, limo y arena.

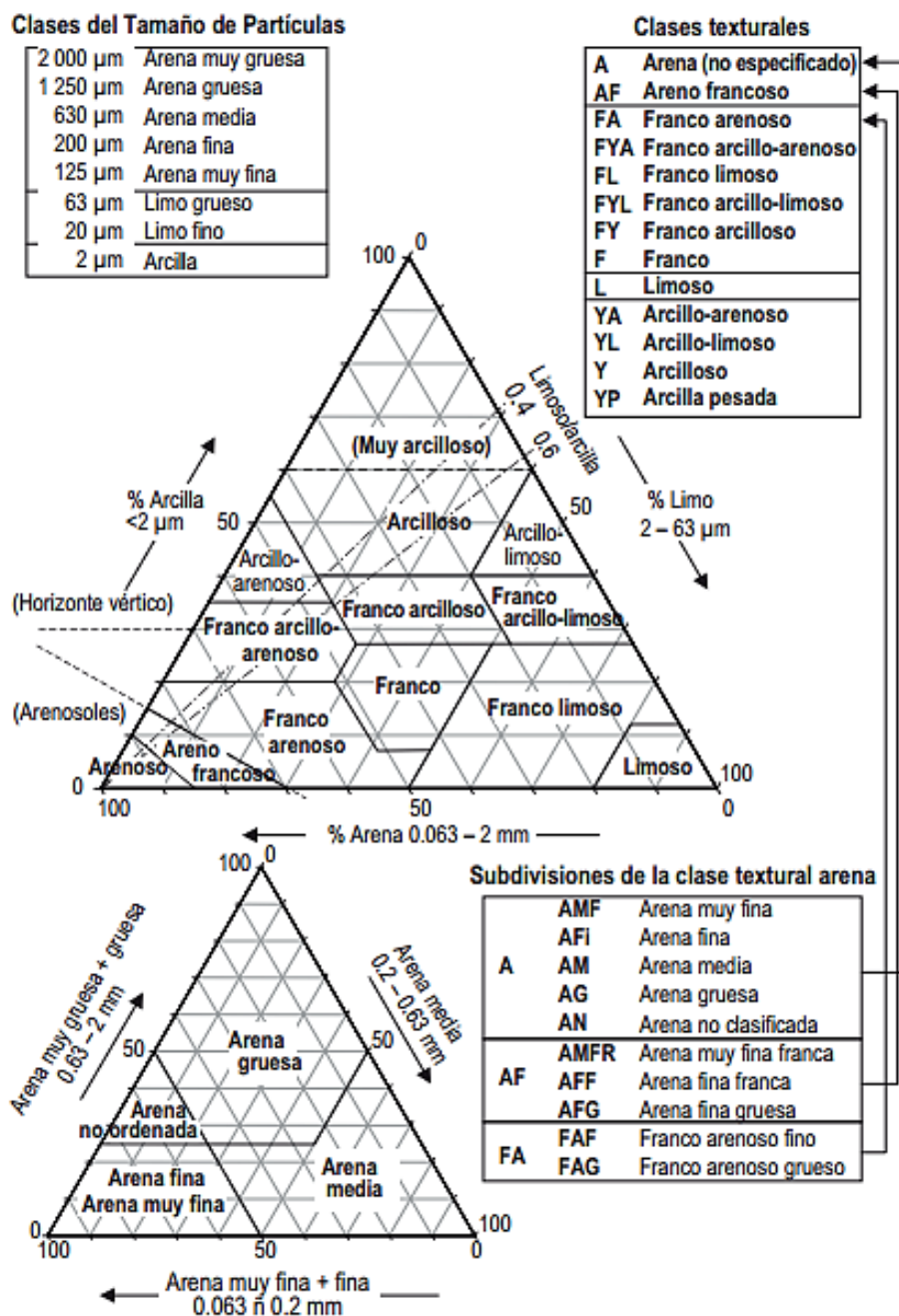


Figura 3. Relación de los constituyentes de tierra fina por tamaño, definiendo las clases texturales y subclases de arena

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), (2009).

Color:

El color de suelo o matriz refleja la composición así como las condiciones pasadas y presentes de óxido – reducción del suelo. Esta determinado generalmente por el revestimiento de partículas muy finas de materia orgánica humidificada (oscuro), óxidos de hierro (amarillo pardo, anaranjado y rojo), óxidos de manganeso (negro) y otros, o puede ser debido al color de la roca parental (FAO, 2009). El color de la matriz del suelo de cada horizonte se debe registrar en condiciones de humedad (o en lo posible las dos condiciones, seco –húmedo) usando las notaciones para matiz, valor y croma como se da en la carta o tabla de Colores de Suelo Munsell (Munsell, 1975, citado por FAO, 2009), (ver figura 4). El sistema de colores de Munsell consiste en tres dimensiones mencionadas anteriormente, basadas en la respuesta humana al color. El matiz, es el color espectral dominante (rojo, amarillo, verde, azul o violeta); el valor, es la claridad u oscuridad de los rango de color de 1(oscuro) a 8 (claro); y el croma, es la pureza o fuerza del rango de color desde 1 (pálido) a 8 (brillante). Cuando no hay un color de suelo matriz dominante se describe como moteado y se dan dos o más colores.



Figura 4. Sistema de color de Munsell

Fuente: Molinari (2011).

Densidad aparente:

La densidad aparente del suelo la define la FAO en su guía para la descripción de suelos como la masa de una unidad de volumen de suelo seco a 105° C. Este volumen incluye tanto sólidos como los poros, por lo que la densidad aparente refleja la porosidad total del suelo.

Valores de densidad aparentes bajos (< 1,3 Kg. dm⁻³) indican generalmente indica una condición porosa del suelo. Los valores de densidad aparente altos indican un ambiente pobre para el

crecimiento de raíces, aireación reducida y cambios indeseables en la función hidrológica como la reducción de la infiltración del agua. La FAO reporta en su guía que una de las formas para determinar la densidad aparente del suelo consiste en obtener un volumen de un suelo conocido, secarlo para remover el agua y pesar la masa seca.

Densidad real:

La densidad real de un suelo es la relación entre la unidad de volumen de peso y la unidad de volumen de la fase sólida del suelo, ya que está determinado por la composición química y mineralógica de la fase sólida. En otras palabras, la densidad real es el peso de las partículas sólidas del suelo, relacionado con el volumen que ocupan sin tener en cuenta su organización en el suelo. No obstante, considerando que la mayor parte de los componentes del suelo (aluminosilicatos, sílice) poseen una densidad que oscila entre 2,6 y 2,7 g.cm⁻³, se toma un valor medio de 2,65 g.cm⁻³. Su cálculo se realiza a través del picnómetro.

Porosidad:

El espacio poroso del suelo se refiere al porcentaje del volumen del suelo no ocupado por sólidos. Este volumen de suelo está constituido generalmente por 50% materiales sólidos y 50% de espacio poroso, el cual en condiciones de capacidad de campo se compone de 25% aire y 25% agua. Dentro del espacio poroso se pueden distinguir macro poros y micro poros donde agua, nutrientes, aire y gases pueden circular o retenerse (FAO, 2016). Los macro poros no retienen agua contra la fuerza de la gravedad, son responsables del drenaje, aireación del suelo y constituyen el espacio donde se forman las raíces. Los microporos retienen agua y parte de la cual es disponible para las plantas. La porosidad del suelo se deriva de la relación entre otras dos propiedades del suelo, la densidad real y la densidad aparente, dicho valor se expresa en %, y se

calcula:

$$\% \text{ porosidad} = \left(\frac{100(Dr - Da)}{Dr} \right)$$

Dónde:

Dr= Densidad real (gr.cm-3)

Da= Densidad aparente (gr.cm-3)

La FAO, 2009 en su guía para la descripción de suelos propone una clasificación para los espacios porosos de los suelos (tabla 7).

Tabla 4. Clasificación de porosidad del suelo

Características	% Porosidad
Muy baja	< 2
Baja	2 - 5
Media	5 - 15
Alta	15 - 40
Muy alta	> 40

Fuente: FAO (2009).

pH:

El pH es una propiedad química del suelo que tiene un efecto importante en el desarrollo de los seres vivos (incluidos microorganismos y plantas). La lectura de pH se refiere a la concentración de iones hidrógeno activos (H^+) que se da en la interfase líquida del suelo, por la interacción de los componentes sólidos y líquidos. Los suelos presentan distinta capacidad de cambio en función del pH. A pH bajos los hidrogeniones están fuertemente retenidos en las superficies de las partículas, pero a pH altos los H de los grupos carboxílicos primero y de los

OH después, se disocian y los H⁺ pueden ser intercambiados por cationes.

Los pH neutros son los mejores para las propiedades físicas de los suelos. A pH muy ácidos hay una intensa alteración de minerales y la estructura se vuelve inestable. En pH alcalino, la arcilla se dispersa, se destruye la estructura y existen malas condiciones desde el punto de vista físico. El valor de pH es el logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno, que se expresa por números positivos del 0 al 14. Tres son las condiciones posibles del pH en el suelo: la acidez, la neutralidad y la alcalinidad. Se propone una escala de valores de pH para clasificar los suelos de acuerdo a esta medida (tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de los suelos según su pH

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5,0
Moderadamente ácido	5,1 – 6,5
Neutro	6,6 – 7,3
Medianamente alcalino	7,4 – 8,5
Fuertemente alcalino	> 8,5

Fuente: Volke, & Velasco (2002).

Materia orgánica:

La materia orgánica del suelo es la fracción orgánica que incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición; tejidos y células de organismos que viven en el suelo; y sustancias producidas y vertidas por esos organismos. En general, la materia orgánica del suelo se clasifica en compuestos húmicos y no húmicos. Un suelo con alto contenido húmico, disminuye la movilidad de los compuestos orgánicos y así la eficiencia de ciertas tecnologías como la extracción de vapores y el lavado de suelos (Volke & Velasco, 2002).

Se propone una escala de valores de materia orgánica para clasificar los suelos de acuerdo a esta medida (tabla 6).

Tabla 6. Valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4,0	< 0,5
Bajo	4,1 – 6,0	0,6 – 1,5
Medio	6,1 – 10,9	1,6 – 3,5
Alto	11,0 – 16,0	3,6 – 6,0
Muy alto	> 16,1	> 6,0

Fuente: Volke, & Velasco (2002).

2.3 Marco Contextual

2.3.1 Historia. La Universidad Francisco de Paula Santander nace como fundación de carácter privado el 5 de julio de 1962, con la Escuela de Economía. Ese mismo año el 19 de septiembre, el gobierno departamental le otorga la personería jurídica y se incorpora a la universidad las escuelas de Topografía y Dibujo.

Su objetivo es elevar el nivel cultural de la juventud nortesantanderana, solucionar el problema de numerosos bachilleres de la localidad que por diversas causas, sobre todo económicas, no pueden seguir estudios en otras ciudades del país y estrechar vínculos de solidaridad.

Por petición escrita del rector de esa época, Dr. José Luis Acero Jordán, se cede para el funcionamiento de la Universidad un local de propiedad del mismo, ubicado en la calle 13 con avenidas 5 y 6 donde inicia labores la UFPS.

En el año de 1968 la Asamblea del Departamento autoriza al gobernador para que gestione el contrato de compra-venta de un lote ubicado en la urbanización Quinta Oriental, lugar donde actualmente se encuentra la UFPS. Ese mismo año se inicia el programa de especialización de profesores en el exterior por medio de Becas de la OEA, a través del Icetex.

El 1 de Junio de 1970 se declara disuelta la Fundación Universidad de Cúcuta Francisco de Paula Santander, constituida como derecho privado y para garantizar su perpetuidad se acepta sea declarada como Universidad Oficial del Departamento: quedando como establecimiento público descentralizado y con personería jurídica.

El número de estudiantes y el progreso de los programas académicos ofrecidos por la UFPS a la región ha aumentado notablemente, en la actualidad tiene una oferta académica respaldada en procesos de calidad conseguidos mediante el trabajo constante de toda la comunidad, en áreas concernientes a la ingeniería, salud, ciencias básicas, ciencias empresariales, ciencias agrarias, ciencias del medio ambiente, educación, artes y humanidades.

Este proyecto de grado modalidad investigación se realizó en el laboratorio de Investigación de Biología Sintética, ubicado en edificio de Laboratorios Básicos (laboratorio 202-segundo piso) adscrito a la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Francisco de Paula Santander, Sede Central-Cúcuta (Avenida Gran Colombia No. 12E-96 Barrio Colsag, San José de Cúcuta-Colombia). La fase de muestreo se realizó en la Finca X, ubicada en el municipio de los Patios, Norte de Santander (coordenadas 7.825401, -72.518528) y la finca Clavellaneda, ubicada en el municipio del Zulia, Norte de Santander (coordenadas 8.062976, -72.579619).

2.4 Marco Legal

Ley 99 de 1993: Crea el Ministerio del Medio Ambiente, reordena el sector público encargado de la gestión y conservación del medio ambiente y los recursos naturales renovables. Dispone también esta ley que cuando las actividades reguladoras por el Ministerio del Medio Ambiente puedan afectar la salud humana, esta función será ejercida en consulta con el Ministerio de Protección Social y por el Ministerio de Agricultura cuando pueda afectarse la sanidad animal o vegetal. En la práctica, como más adelante se verá, el Ministerio del Medio Ambiente no es el principalmente regulador en materia de seguridad en la biotecnología.

Ley 491 de 1999: Crea los seguros ecológicos como un mecanismo que permita cubrir los perjuicios económicos cuantificables como consecuencia de daños al ambiente y a los recursos naturales.

Ley 599 de 2000: Mediante la cual se expide el Código Penal, establece penas para delitos como la introducción y explotación ilegal de los recursos fáunicos, forestales, florísticos o de los recursos genéticos, el manejo ilícito de microorganismos nocivos, experimentación ilegal en especies animales o vegetales y daños a los recursos naturales y contaminación ambiental.

Resolución 1115 de 2000: Ministerio del Medio Ambiente. Por medio de la cual se determina el procedimiento para el registro de colecciones biológicas con fines de investigación científica.

3. Diseño Metodológico

3.1 Tipo de Investigación

La investigación que se desarrolló es de tipo aplicada-experimental, ya que estos análisis se han reportado en estudios respecto a la temática de esta investigación, realizando análisis cuantitativos como cualitativos. La originalidad del presente trabajo es la evaluación de la capacidad de asimilación (degradación) del clorpirifos, aprovechando microorganismos nativos de suelos de arroz en los que se ha aplicado clorpirifos como pesticida para el control de plagas y enfermedades. La evaluación incluye la caracterización fisicoquímica de muestras de suelos de fincas de arroz de la región de Norte de Santander (Zulia y Vados), el aislamiento de los microorganismos presentes en las muestras de suelos de arroz, la evaluación de tolerancia al clorpirifos a diferentes concentraciones de los aislamientos obtenidos, la caracterización molecular de los microorganismos con tolerancia al clorpirifos y la evaluación de asimilación en etapa de invernadero. La selección de éstas variables está enfocada a optimizar el proceso de degradación del pesticida con la microflora nativa de estos suelos contaminados con clorpirifos. En la práctica, la aplicación de los resultados obtenidos permitiría ampliar los estudios respecto a la biorremediación de compuestos persistentes en los suelos agrícolas bajo influencia de agroquímicos plaguicidas como el clorpirifos.

3.2 Población y Muestra

3.2.1 Población. Para este proyecto la población objeto son los suelos arroceros que fueron recolectadas en los municipios del Zulia y los Patios en Norte de Santander.

3.2.2 Muestra. La muestra de la presente investigación corresponde a los suelos de dos fincas arroceras seleccionadas aleatoriamente en el municipio del Zulia y los Patios en Norte de

Santander.

3.3 Hipótesis

Realizando la experimentación se podrá determinar si alguno de los microorganismos aislados de suelos con cultivos de arroz tiene la capacidad de tolerar el clorpirifos y de utilizarlo como fuente de carbono y energía.

3.4 Variables

3.4.1 Variables independientes. A continuación, se muestran las variables independientes:

Tabla 7. Variables independientes

Variables	Nivel de medición	Escala	Descripción	Indicador
Materia orgánica	Cuantitativa	Alta Media Baja	Según titulación obtenida	%
pH	Cuantitativa	Alta Media Baja	Según escala del multímetro	Grado de acides o alcalinidad
Densidad aparente (Da)	Cuantitativa	Alta Media Baja	Según la masa y el volumen del suelo	g/ mL
Densidad real (Dr)	Cuantitativa	Alta Media Baja	Según la masa y el volumen del suelo	g/ mL
Porosidad	Cuantitativa	Alta Media Baja	Según la relación entre Dr y Da	%
Textura	Cuantitativa	Alta Media Baja	Según la lectura en el hidrómetro	%
Tolerancia al clorpirifos	Cualitativa	Crecimiento	Crecimiento del microorganismo	UFC/ml

3.4.2 Variables dependientes. Las variables dependientes se presentan a continuación:

- Volatilización del contaminante
- Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del suelo
- Intensidad lumínica
- Degradación abiótica del contaminante.

3.5 Fases de la Investigación

3.5.1 Determinación de las características fisicoquímicas del suelo contaminado.

Inicialmente se realizó una recopilación y evaluación de las características del suelo, las cuales se utilizaron como referencia para evaluar los resultados obtenidos en el proyecto.

Se ubicaron tres áreas de muestreo de zonas productoras de arroz en el Departamento de Norte de Santander. El muestreo se realizó completamente al azar, y se recolectaron 10 submuestras a una profundidad de 15 cm aproximadamente. Las muestras se homogenizaron para obtener un peso final de 2Kg y fueron introducidas en bolsas plásticas y transportadas al laboratorio en neveras de icopor (ver anexo 2).

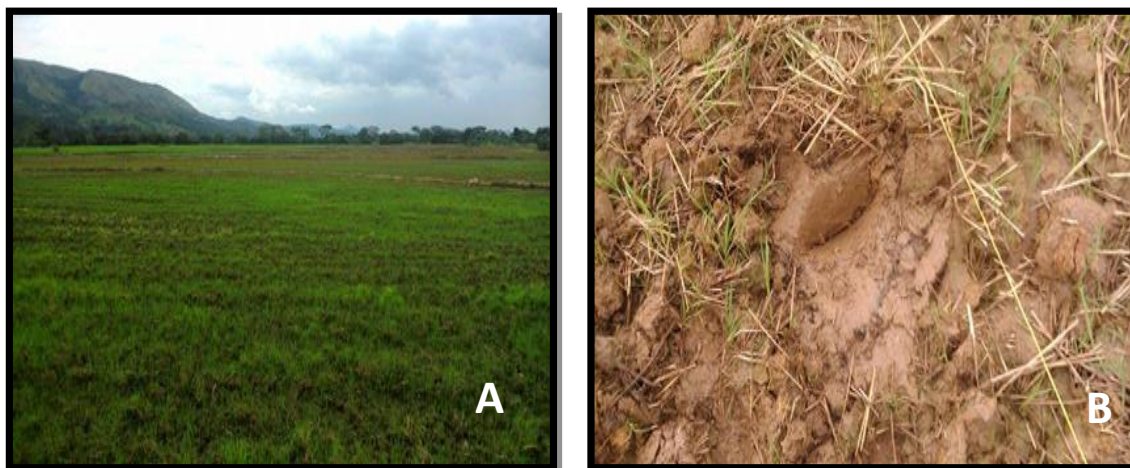


Figura 5. Ubicación y toma de las muestras de suelos arroceros A) Ubicación de la toma de muestras de suelos de fincas de cultivo de arroz, Zulia Norte de Santander; B) Recolección de la submuestra de suelo en la ubicación de un punto en el área delimitada

Una vez obtenidas las muestras, se recolectó 1Kg de suelo al que se le hizo cuarteo, molida y tamizaje para realizar los siguientes análisis fisicoquímicos: Textura (método Bouyoucos), pH (Potenciométrico), densidad aparente (Terrón parafinado), densidad real (Potenciómetro) carbono orgánico (método Walkley y Black), y fósforo disponible (Bray II), realizados en el Laboratorio de Investigación, edificio de Laboratorios Básicos (laboratorio 202-segundo piso).

3.5.1.1 Determinación de la materia orgánica. La determinación de materia orgánica (M.O) se evaluó a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black. El método se basa en la oxidación del carbono orgánico presente en la muestra de suelo por medio de agentes químicos y posterior titulación. Se pesó 0.5 gramos (g) de suelo seco en un matraz, posteriormente se añadieron 10 mL de dicromato de potasio 1N (KMnO_4), se giró cuidadosamente el matraz para homogenizar la reacción. Luego se agregó 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y se procedió a agitar aproximadamente por un minuto y posterior

reposo durante 30 minutos. Culminado el tiempo se añadió 200 mL de agua destilada y 5 mL de ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4). Finalmente se adicionó 10 gotas de difenilamina como indicador y se procedió a titular con sulfato ferroso heptahidratado 1N ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Se registró el volumen de titulante usado. La prueba se realizó por triplicado y se usó un blanco (sin suelo) como control.

La ecuación empleada para la determinación de M.O=

Materia orgánica = % Carbono orgánico * 1,724

Donde la determinación de carbono orgánico se realiza con la siguiente ecuación =

$$\% \text{ carbono orgánico} = \left(\frac{\text{B} - \text{T}}{\text{g}} \right) (\text{N}) (0,39) \text{mcf}$$

Donde;

B= Volumen de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ gastado para valorar el blanco (mL)

T= Volumen de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ gastado para valorar la muestra (mL)

N= Normalidad exacta del $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

g= Peso de la muestra empleada (g)

m.c.f= Factor de corrección de humedad

3.5.1.2 pH. La determinación del pH del suelo medido en agua se realizó a través del método AS-02. La evaluación se basó en la determinación de la actividad del ion H mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensible al H. Se pesó 10 g de suelo en un frasco de vidrio, se

adicionó 30 mL de agua destilada y se procedió a agitar magnéticamente durante 15 minutos. Posteriormente se calibró el sensor con soluciones reguladoras de pH (4,0 - 7,0 - 10,0) y enjuagando con agua destilada los electrodos antes de iniciar las lecturas de las muestras. Ya calibrado los electrodos se procedió a agitar la suspensión y registrar el valor del pH al momento que se haya estabilizado. La prueba se realizó por triplicado y se usó un blanco (agua destilada) como control.

3.5.1.3 Densidad real. La determinación de la densidad real (DR) de los suelos puede ser calculada a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa y el volumen de una cierta cantidad de suelo. La masa es determinada pesando directamente el suelo y el volumen de manera indirecta por el cálculo de la masa y la densidad del agua desplazado por la muestra de suelo.

Los cálculos se llevan a cabo con la siguiente ecuación:

$$DR = \left(\frac{\frac{ps}{Vs}}{\rho_{H_2O}} \right)$$

Donde;

ps: Peso de las partículas del suelo.

Vs: Volumen de las partículas del suelo (Peso del agua desplazada por las partículas del suelo entre la densidad del agua).

3.5.1.4 Densidad aparente. La determinación de la densidad aparente (Da) se llevó a cabo a partir de la muestra de suelo sin disturbar se tomó un agregado firme de un tamaño alrededor de 2

cm, se pesó y se sumergió en parafina líquida a 60 °C, sin que se formen burbujas, se dejó enfriar y se pesó. Luego se sumergió el terrón en la probeta que contiene agua. Se midió el volumen desalojado por el terrón, cuando se sumergió en la probeta.

$$D_a = \left(\frac{M}{V_r} \right)$$

Donde;

M: masa del suelo: [Peso (probeta + suelo) – Peso probeta]

V_t: Volumen total: Volumen de la probeta: 10 mL

3.5.1.5 Porosidad. La porosidad del suelo se deriva de la relación entre otras dos propiedades del suelo, la densidad real y la densidad aparente, dicho valor se calculó utilizando la ecuación propuesta por Urum, (2014):

$$\% \text{ porosidad} = \left(\frac{100(D_r - D_a)}{D_r} \right)$$

Dónde:

D_r= Densidad real (gr.cm-3)

D_a= Densidad aparente (gr.cm-3)

3.5.1.6 Textura. La determinación de la textura del suelo se realizó utilizando el hidrómetro de Bouyoucos (ASTM 152H) aplicando el método AS-09. En el procedimiento se manejan 40 segundos para la separación de partículas mayores de 0.05 mm (arena) y de dos horas para partículas de diámetros mayores de 0.002 mm (limo y arena). Estos límites han sido establecidos

por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos y se han usado para construir el triángulo de texturas. El procedimiento se inició pesando 50 g de suelo, posteriormente se agregó 600 mL de agua destilada y 10 mL de hexametáfosfato de sodio ((Na₃PO₃)₆), a una concentración de 50 g.L⁻¹. La mezcla anterior se colocó en agitación durante 2 minutos, posteriormente se adicionó en una probeta de 1 L y se aforó con agua destilada. Se agitó por inversión 10 veces y pasado 40 segundos se registró la primera lectura con el hidrómetro y la temperatura. El sistema probeta – hidrómetro se dejó reposar por 2 horas, momento en el cual se registró la segunda lectura y la segunda temperatura.

Se usaron las siguientes ecuaciones para determinar los porcentajes de arcilla, limo y arena:

$$\% \text{ Arcilla} = \left[\frac{2^{\circ} \text{ Lectura} + ((T_2 - 20) * 0,36)}{\text{g Suelo}} \right] * 100$$

$$\% \text{ de Limo} + \% \text{ Arcilla} = \left[\frac{1^{\circ} \text{ Lectura} + ((T_2 - 20) * 0,36)}{\text{g Suelo}} \right] * 100$$

$$\% \text{ Arena} = 100 - (\% \text{ de limo} + \% \text{ arcilla})$$

Posteriormente por medio del triángulo de las texturas se determinó el tipo de suelo.

3.5.2 Aislamiento y conservación microbiana. La cuenta de bacterias totales o bacterias heterótrofas del suelo hace referencia a aquellas que obtienen su fuente de carbono a partir de compuestos orgánicos disponibles. La técnica empleada fue cuenta por dilución en placa con agar nutritivo como medio de crecimiento. El procedimiento inició adicionando 10 gr de suelo en un matraz con 90 mL de solución salina isotónica estéril. Se dispersó el suelo y homogenizó con agitación vigorosa en vórtex. Posteriormente se tomó 1 mL y se transfirió a un tubo con 9 mL de solución salina estéril. De ahí se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar la dilución deseada

(garantizando esterilidad en el manejo). Se agitó vigorosamente en cada o dilución realizada. Luego de obtener las diluciones seriadas se tomó 0.1 mL de la dilución seriada y se colocó en el centro de la superficie de las cajas con agar nutritivo (ver anexo 3). Finalmente se procedió a extender la alícuota en la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada (inmersa en alcohol y pasándola por la flama del mechero permitiendo su enfriamiento). Luego se incubaron las placas a 30°C durante 24 – 48 horas (Anexo 4.).



Figura 6. Diluciones seriadas decimales para el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las muestras de suelo de fincas de arroz

Con el fin de obtener un número considerable de microorganismos presentes en el suelo, teniendo en cuenta que estos suelos han sido sometidos a tratamientos con agroquímicos, se realizó el aislamiento de colonias bacterianas que crecieron en etapa de laboratorio, se construyó un modelo de ficha técnica para identificar y caracterizar al microorganismo aislado, tanto macroscópicamente como microscópicamente y se conservaron en solución salina estéril (0,85%) en microtubos de conservación y se mantuvieron en refrigeración a 4°C (ver anexo 5).

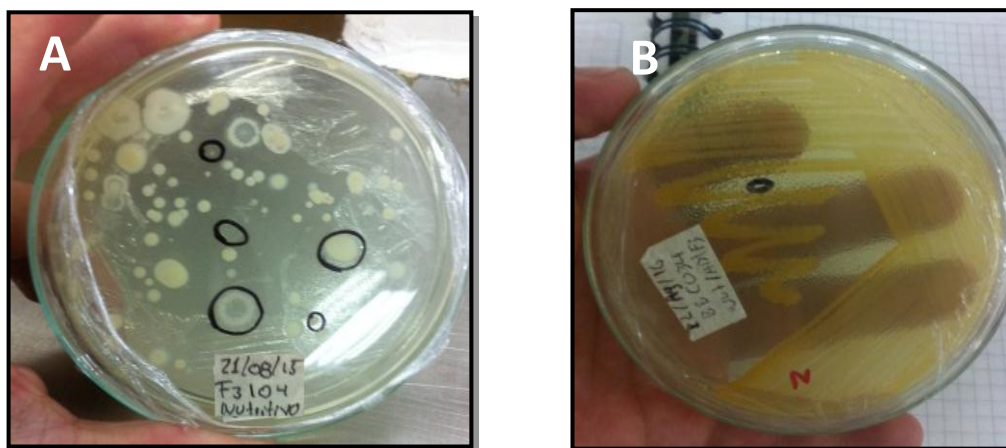


Figura 7. A) selección de los microorganismos obtenidos de las muestras de suelo de fincas de arroz; B) aislamientos y purificación de un microorganismo obtenido de las muestras de suelo de las fincas de arroz

3.5.3 Selección y caracterización genotípica de las bacterias aisladas en suelos arroceros.

A continuación, se evidencia la selección y caracterización genotípica de las bacterias aisladas en suelos arroceros:

3.5.3.1 Selección de microorganismos. Para seleccionar los microorganismos que usaron el contaminante como fuente de carbono en el cual se usó el medio MSM como caldo para el crecimiento microbiano. Se tomaron concentraciones bajas del contaminante (10ppm) y se transfirió al medio para el crecimiento microbiano re-aislando, aquellos microorganismos que puedan crecer en las condiciones establecidas en el medio de cultivo. Los aislamientos obtenidos fueron procesados para conocer mejor el potencial de microorganismos con respecto a la degradación del contaminante.

3.5.3.2 Pruebas de tolerancia. Este ensayo se realizó con el fin de conocer cuál es la concentración más alta del contaminante a la que era capaz de crecer cada uno de los microorganismos aislados preliminarmente. El inóculo inicial se tomó de una colonia crecida (5 x

10^7 UFC/mL) en 20ml de un medio de cultivo de mantenimiento y se introdujo en un erlemeyer de 50 ml con una concentración inicial del contaminante de $10\text{mg/L} + 1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glucosa. Se llevó a incubar en un agitador orbital a 150 rpm, y una temperatura ambiente, bajo condiciones de oscuridad por 96h. Para evaluar la tolerancia se realizó aumentos de la concentración (50mg/L, 100mg/L, 200mg/L, 300mg/L, 600mg/L y 1200mg/L) del contaminante hasta que ya no se observó un crecimiento microbiano adecuado. Al finalizar el tiempo de cada prueba se verificó el crecimiento del microorganismo a las condiciones expuestas.



Figura 8. Ensayo a diferentes concentraciones del tolerancia al pesticida clorpirifos de los microorganismos aislados A) frascos con 20ml de medio mínimo mineral envueltos en aluminio, momentos previos a la aplicación de pesticida; B) montaje del ensayo evaluando algunos aislamientos para determinar la tolerancia al pesticida clorpirifos

3.5.3.3 Identificación por el gen DNAr 16S. La extracción de ADN se realizó mediante el kit de extracción UltraClean Microbial DNA Isolation. Seguido de ello se amplificó el DNAr 16S y se secuenciaron las bacterias que reportaron mejores resultados durante las pruebas de tolerancia realizadas.

Amplificación del DNAr 16S: Para lograr la amplificación del gen DNAr 16S de las bacterias diazotrofas se utilizaron los iniciadores universales 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5' AGAAAGGAGGTGATCCAG CC 3'). A partir del ADN extraído con anterioridad y se realizaron las reacciones de amplificación con una concentración de 25µg utilizando los reactivos necesarios para proceder a realizar la amplificación del material genético. Para confirmar el tamaño y la pureza de los productos amplificados por PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X dejando correr a 55 voltios por tres horas. Adicionalmente se utilizó un marcador de peso molecular para determinar el tamaño de las bandas y se usaron dos controles, uno negativo el cual consistía en una muestra sin DNA y un control positivo (cepa de referencia) el cual permitió esclarecer las muestras procesadas, finalmente se observaron en un transiluminador de UV.

Análisis filogenético: Una vez obtenido el material listo y en condiciones, éste se envió al centro a CorpoGen (investigación y biotecnología) para realizar la respectiva secuenciación de los fragmentos amplificados, una vez se obtuvieron, fueron comparadas en bases de datos, como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y EMBL (European Molecular Biology Laboratory) para finalmente poder obtener la identificación molecular de los microorganismos con potencial en la biorremediación.

3.5.4 Evaluación de la respuesta de los microorganismos aislados con el mayor índice de tolerancia a clorpirifos bajo condiciones de invernadero. Se realizó para el modelo de evaluación de los microorganismos con potencial para degradar clorpirifos un ensayo en plántulas de arroz en suelo estéril y no estéril. Dicho suelo se adicionó en bolsas negras de 1 kg de capacidad a un volumen uniforme para todas las bolsas, en condiciones de invernadero. Para los tratamientos con suelo estéril se realizó un proceso de esterilización donde se sometió el suelo

a tres ciclo de esterilización (15 lb de presión a 120°C por 50 minutos), se repitió este ciclo a las 24 horas después de su esterilización respectiva, con el fin de tener de evitar la proliferación y crecimiento de la microflora nativa de las muestras de suelo, este proceso se realizó en un autoclave convencional del laboratorio. El ensayo contó con un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2 para un total de 4 tratamientos más los controles establecidos y tres replicas por cada tratamiento. Cada replica se mantuvo en un recipiente de plástico y permaneció saturado de agua para mantener inundado el suelo. Las dosis seleccionada para la aspersión del contaminante fue la misma que la empleada en el cultivo de arroz (1 litro/ hectárea de suelo, equivalentes a 480mg/l), teniendo en cuenta que como las unidades experimentales son pequeñas, se necesitaron volúmenes bajos del pesticida (17 µl/unidad experimental).

Tabla 8. Tratamientos para el ensayo de evaluación de microorganismos con potencial para degradar clorpirifos aislados de suelos de fincas de arroz

Tratamiento	
1	<ul style="list-style-type: none"> • Suelo no estéril • Microorganismo (BBC032) • Dosis de Clorpirifos
2	<ul style="list-style-type: none"> • Suelo no estéril • Consorcio establecido (BBC032, BBC029, BBC042) • Dosis de Clorpirifos
3	<ul style="list-style-type: none"> • Suelo estéril • Microorganismo (BBC032) • Dosis de Clorpirifos
4	<ul style="list-style-type: none"> • Suelo estéril • Consorcio establecido (BBC032, BBC029, BBC042) • Dosis de Clorpirifos
Controles	
5	<ul style="list-style-type: none"> • Suelo no estéril • Dosis de Clorpirifos
6	<ul style="list-style-type: none"> • Suelo no estéril • Consorcio establecido (BBC032, BBC029, BBC042)

Con el fin de establecer un sistema que se ajuste a las condiciones de campo, se ajustó un modelo en fase de invernadero con plántulas de arroz. Se realizó una desinfección a las semillas y se colocaron en cámaras húmedas para su germinación en agar agua, por 4 días. Cada réplica del tratamiento contó con 6 semillas pre-germinada de arroz. Antes de la siembra de las semilla pre-germinadas, el suelo según el tratamiento fue inoculado con los microorganismos; para este caso en el tratamiento T1 y T3 se utilizó el microorganismo (BBC032, Anexo 6) con el mejor resultado en las pruebas de tolerancia al pesticida y en el tratamiento T2 y T4 un consorcio compuesto por tres cepas, en donde una de las cepas correspondió al microorganismo de los tratamientos T1 y T2 y las dos cepas restantes se seleccionaron en orden consecutivo con respecto al resultado de tolerancia (BBC032, BBC029, BBCO42; Anexo 6).

Transcurridos los 20 días del ensayo, se estimó la participación microbiana en la degradación del contaminante, para ello se evaluó la densidad poblacional en cada tratamiento mediante el recuento de UFC en con diluciones seriadas hasta 10^{-5} , tomando registro en cinco momentos: Uno previo a la aspersión del contaminante, 0 h, 24 h, 48 h, 192h y 360h después de la aplicación.



Figura 9. Evaluación de los microorganismos con el mayor índice de tolerancia al clorpirifos en etapa de invernadero; A y B) Obtención de la biomasa de los aislamientos BBC029, BBC032 y BBC042 seleccionados para hacer el ensayo en invernadero; C y D) Montaje de las unidades experimentales de cada tratamiento para la posterior evaluación de los microorganismos frente al clorpirifos en condiciones de invernadero

3.5.5 Análisis estadístico. El tratamiento de datos se realizó en Excel 2013 (15.0.4797.1000) MSO (15.0.4797.1000) y el análisis de varianza de la evaluación de la respuesta de los microorganismos aislados con el mayor índice de tolerancia a clorpirifos bajo condiciones de invernadero en Statistical Analysis System, SAS®. La significancia del diseño experimental implementado (diseño factorial general, con dos factores) fue evaluado mediante el test de Tukey ($\alpha=0.05$).

4. Resultados y Análisis

4.1 Caracterización Físicoquímica de las Muestras de Suelo Recolectadas Procedente de Cultivos de Arroz

La caracterización físicoquímica del suelo permitió establecer las condiciones de las propiedades de esta matriz y posteriormente establecer la viabilidad del tratamiento para ser aplicado al tipo de suelo presente en este estudio. La siguiente tabla permite establecer los parámetros físicoquímicos de los suelo bajo estudio.

Tabla 9. Parámetros físicoquímicos del suelo

Parámetros	Valor			Método	
	Muestra	F1	F2		F3
Materia orgánica		2,23%	3,43%	2,75%	Walkley y Black
Densidad aparente		1,46 g.ml	1,57 g.ml	1,43 g.ml	Terrón parafinado
Densidad relativa		2,07 g.ml	1,57 g.ml	1,91 g.ml	Picnómetro
pH		8,26	7,80	8,33	Potenciométrico
fosforo		22,67 µg/ml	133,08 µg/ml	76,67 µg/ml	Bray II
Textura		Suelo franco-arcilloso	Suelo franco	Suelo franco-arenoso-arcilloso	Bouyoucos
Porosidad		29,4%	21,01%	25,13%	Urum

Fuente: Duran (2017).

Estas texturas corresponden a suelos con vocación agrícola, siendo congruentes con el uso que han tenido a la fecha. La muestra F1 (Zulia) presenta un suelo mucho más compacto por el

alto contenido de arcilla (33%) aspecto que es característico de los suelos pertenecientes a la zona del Zulia (INE, 2010).

Parámetros como la densidad aparente son importantes cuando hablamos del suelo, debido a que permiten vislumbrar la calidad del suelo y la función del ecosistema presente en dicha matriz (FAO, 2009). Valores de densidad relativamente bajos ($<1,3 \text{ Kg.m}^3$) indican una condición porosa del suelo, para efecto de nuestros suelos reportamos valores $>1,3 \text{ Kg.m}^3$, (promedio $1,48 \text{ Kg.m}^3$), aunque es un valor por encima de $1,3 \text{ Kg.m}^3$, no necesariamente representa suelos con densidad aparente alta, debido a que estos suelos indican un ambiente pobre para el crecimiento de raíces, aireación reducida, y cambios indeseables en la función hidrológica como la reducción de la infiltración del agua, aspectos que no se correlacionan con los valores de porosidad calculados (promedio 25%), debido a que según la FAO (2009), estos suelos se clasifican con una porosidad alta (15 -40%) por lo cual facilita la aireación favoreciendo el crecimiento bacteriano (aerobio).

El valor pH reportado (8,13) permite discernir el grado alcalino que presentan los suelos muestreados. Se considera un aspecto esencial en la degradación de clorpirifos el pH del medio, según Hernández (2017), en su estudio concluyen que a pH alcalinos se logró la mejor degradación de clorpirifos, sin embargo, resalta el aspecto de que ciertos microorganismos pueden llegar a degradar clorpirifos en medios ácidos como alcalinos, un ejemplo de ello serían *B. pumilus* y *Enterobacter sp* (Singh, Walker & Wright, 2006; Anwar, Liaquat, Khan, Khalid & Iqbal, 2009).

Un aspecto relevante en la eliminación de contaminantes de los suelos son los procesos de atenuación natural, donde el contaminante es degradado o transformado químicamente bajo

reacciones fotolíticas, de óxido-reducción e hidrólisis química. Estos procesos favorecen la excitación, ruptura y/o reacomodación de enlaces químicos (Narváez, 2012). En este sentido, asumimos que la concentración de contaminante presente en las unidades experimentales no solo fue asimilada por el microorganismo y/o consorcio establecido, sino que procesos de volatilización, o degradación por procesos que implican reacciones fotolíticas han mediado en la degradación de los contaminantes presentes en el suelo. Se resalta el hecho de que el clorpirifos se caracteriza por ser moderadamente tóxico y tiene una vida media en el suelo de 10 a 120 días (Hernández, 2017).

4.2 Aislamiento y Descripción Fenotípica de los Microorganismos Presentes en las Muestras de Suelo de los Cultivos de Arroz

El desarrollo de la presente fase permitió aislar y conservar 43 microorganismos, de los cuales para la muestra F1 corresponden 15 microorganismos, 14 microorganismos para la muestra F2 y 14 microorganismos para la muestra F3 respectivamente (ver anexo 6).

El suelo es una matriz diversa, con procesos complejos, cuenta con micro y macro organismo que hacen parte de este, formando e interactuando en los ecosistemas. El resultado de dichas interacciones suelo – microorganismo inciden directamente en el desarrollo de los procesos agrícolas. Autores como Fernández, Ferrando, Macazaga & Fernández (2005), en sus estudios las características morfológicas (caracterización macroscópica y microscópica) de los microorganismos aislados de los suelos con vocación agrícola, siendo estas características comunes con los aislados obtenidos en los suelos bajo estudio. Este aspecto se correlaciona con el hecho de que los cultivos de arroz en su fase de anegación tienen la particularidad de que durante gran parte del ciclo los procesos que ocurren en las inmediaciones de la raíz son anaerobios

(Fernández et al., 2005). Sin embargo, la limitación de oxígeno no restringe la actividad microbiana en ese ecosistema, que es particularmente apto para el desarrollo de bacterias que no toleran el oxígeno o que pueden sustituirlo por otras moléculas en su metabolismo respiratorio (Fernández et al., 2005). Se asume que los microorganismos que habitan en suelos arroceros son bacterias metanogénicas, reductoras de sulfato, fotótrofas de azufre, fotótrofas no de azufre, oxidadoras de amonio, desmitificadora y en mayor medida bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias, heterótrofas anaerobias y heterótrofas aerobias (Fernández et al., 2005).

El número de cepas aisladas de los suelos muestreados, permite discernir la viabilidad para aplicar tratamientos biológicos con el fin de remediar suelos contaminados con clorpirifos, debido a que el autor Hernández (2017), afirma que la biodiversidad microbiana del suelo a biorremediar influye en la degradación de clorpirifós.

4.3 Identificación de los Microorganismos con Potencial para Tolerar Diferentes Concentraciones de Clorpirifos a nivel de Laboratorio

La tabla 10. Describe el crecimiento (1 o 0) de los aislamientos sometidos al ensayo de tolerancia al pesticida clorpirifos. El indicador a una respuesta positiva a tolerancia al pesticida se representó con el número “1” en la tabla, contrario a lo anterior, si el microorganismo no presentó respuesta a la concentración del pesticida se representó con el número “0”. Las franjas amarillas indicaron que el aislamiento evaluado no creció en la primera etapa del ensayo de tolerancia al pesticida, infiriendo que el microorganismo no es capaz de utilizar el pesticida clorpirifos como fuente de carbono y energía en la dosis mínima en este estudio (10 mg/L). Los microorganismos evaluados que toleraron todas las concentraciones del ensayo en estudio se representan con una franja verde.

Tabla 10. Ensayo de microorganismos a diferentes concentraciones de clorpirifos

		10 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	300 mg/L	600 mg/L	1200 mg/L
	código	clorpirifos	clorpirifos	clorpirifos	clorpirifos	clorpirifos	clorpirifos
1	BBC001	0	0	0	0	0	0
2	BBC002						
3	BBC003	0	0	0	0	0	0
4	BBC004	1	1	1	1	1	0
5	BBC005	1	1	1	1	0	0
6	BBC006	0	0	0	0	0	0
7	BBC007	1	1	0	0	0	0
8	BBC008	0	0	0	0	0	0
9	BBC009	1	1	0	0	0	0
10	BBC010						
11	BBC011	1	1	1	0	0	0
12	BBC012	1	1	0	0	0	0
13	BBC013	1	1	0	0	0	0
14	BBC014	0	0	0	0	0	0
15	BBC015	1	1	1	0	0	0
16	BBC016	0	0	0	0	0	0
17	BBC017	1	1	1	1	1	1
18	BCC018	1	1	0	0	0	0
19	BCC019	1	1	1	1	0	0
20	BBC020	1	1	0	0	0	0
21	BBC021	1	1	1	1	0	0
22	BBC022						
23	BBC023	1	1	1	1	1	0
24	BBC024	1	1	1	0	0	0
25	BBC025	1	1	1	1	0	0
26	BBC026	0	0	0	0	0	0
27	BBC027	1	1	1	1	0	0
28	BBC028	1	1	1	1	0	0
29	BBC029	1	1	1	1	1	1
30	BBC030	1	1	0	0	0	0
31	BBC031	1	1	1	1	1	1
32	BBC032	1	1	1	1	1	1
33	BBC033	1	0	0	0	0	0
34	BBC034	1	1	1	0	0	0
35	BBC035						

		10 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	300 mg/L	600 mg/L	1200 mg/L
	código	clorpirifos	clorpirifos	clorpirifos	clorpirifos	clorpirifos	clorpirifos
36	BBC036	0	0	0	0	0	0
37	BBC037	1	1	1	1	1	1
38	BBC038	1	1	1	1	1	1
39	BBC039	1	1	1	1	1	0
40	BBC040	1	1	1	1	1	1
41	BBC041	0	0	0	0	0	0
42	BBC042	1	1	1	1	1	1
43	BBC043	1	1	1	0	0	0

En total 18% (8 de 43) de los microorganismos evaluados obtuvieron la mejor respuesta ante la concentración más alta del ensayo de tolerancia al pesticida clorpirifos (1200 mg/L) (Tabla 11), estos resultados permiten plantear la viabilidad de los microorganismos aislados y que han mostrado la mejor respuesta a tolerancia al pesticida para ser usados en la degradación biológica del contaminante. Podemos comprender sobre las posibles especies a las cuales puedan pertenecer estas cepas, haciendo énfasis en los microorganismos con capacidad para degradar clorpirifos reportados en la literatura, ejemplo de ello es lo reportado por Anwar et al. (2009), quienes describen que el microorganismo evaluado en su estudio (*B. pumilus* C2A1), tuvo la capacidad de degradar 900 mg/L. Briceño, Fuentes, Palma, Jonquera, Amoroso & Diez, 2012; Cycoñ, 2013; Silambarasan y Abraham 2013, reportan que existe un amplio rango de microorganismos que tienen la capacidad de degradar clorpirifos. Algunos de estos son *Bacillus pumilus*, *Streptomyces sp.*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes sp.*, *Penicillium sp.* y *Pseudomonas putida*.

En la figura 9 se observa el crecimiento de los aislamientos posterior al ensayo en fase de laboratorio donde se evaluó la tolerancia al clorpirifos, podemos inferir que a partir de la turbidez que presenta el medio de cultivo líquido en el cual se agregó una concentración del clorpirifos

como única fuente de carbono (ver figura 9A), existe un crecimiento bacteriano el cual determina que el aislamiento es capaz de asimilar la concentración a la cual se evaluó el microorganismo; del mismo modo estos resultados se correlacionan enfrentado dos aislamientos diferentes frente a la misma concentración (ver figura 9B), donde se observó que no hubo crecimiento alguno o turbidez en el medio de cultivo en comparación al otro aislamiento evaluado.

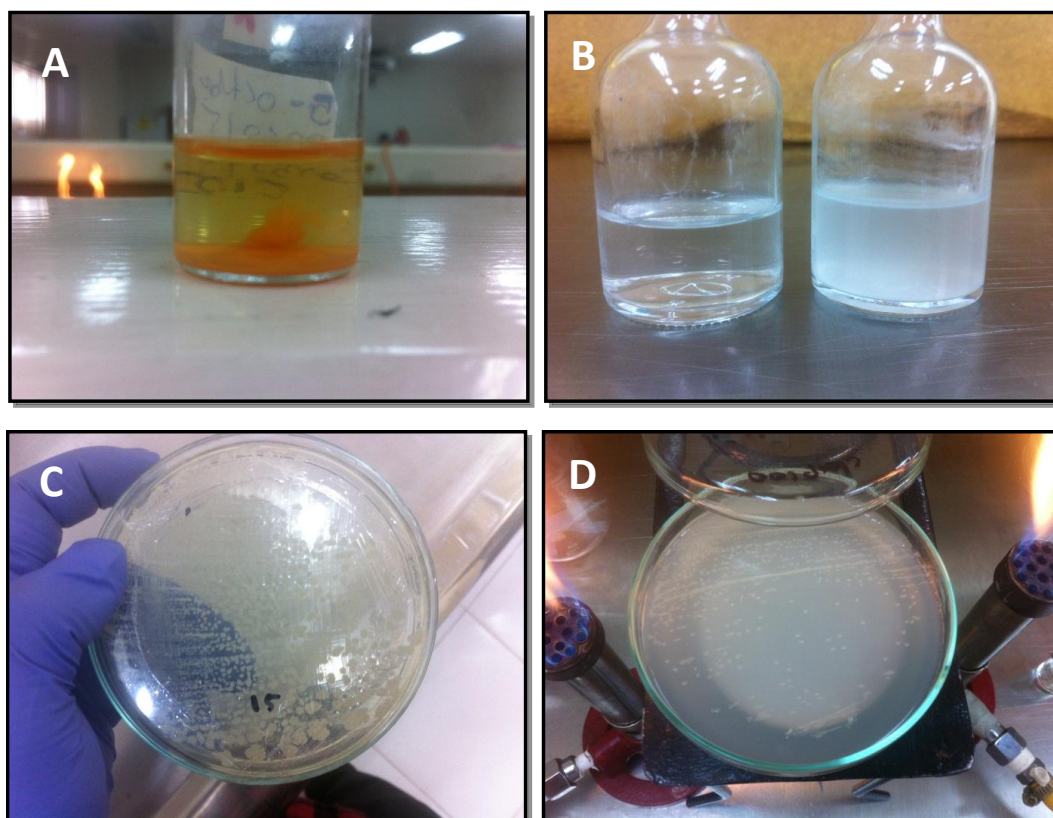


Figura 10. Crecimiento de los aislamientos frente al pesticida clorpirifos en fase de laboratorio A) aislamiento BBC034 capaz de tolerar 50mg/l del clorpirifos; B) Aislamientos BBC034 (izquierda) y aislamiento BBC032 (derecha) evaluados a la concentración 300mg/l de clorpirifos; C) Aislamiento BBC038 capaz de crecer en medio solido nutritivo a una concentración de 1200 mg/l de clorpirifos; D) Aislamiento BBC039 donde obtuvimos poco crecimiento de biomasa a una concentración de 900mg/ de clorpirifos en un periodo de 48 horas

Tabla 11. Aislamientos con la mejor tolerancia al pesticida clorpirifos

Muestra suelo	Caracterización Código
F2	BBC017
F2	BBC029
F3	BBC031
F3	BBC032
F3	BBC037
F3	BBC038
F3	BBC040
F3	BBC042

4.4 Identificación Molecular de los Microorganismos con Capacidad de usar el Pesticida Clorpirifos como Fuente de Carbono y Energía

La identificación molecular de los microorganismos con potencial para degradar clorpirifos se le realizó a las cepas que han mostrado la mejor tolerancia y asimilación del pesticida clorpirifos identificadas con el código BBC029, BBC032 y BBC042, las cuales fueron seleccionadas por ser las más representativas respecto al crecimiento bacteriano frente a la concentración más alta (1200 mg/L) en el ensayo de tolerancia al clorpirifos. La tabla12 nos permite relacionar la especie según el 16s RNAr para las cepas seleccionadas.

Tabla 12. Identificación molecular de los microorganismos con mejor tolerancia a clorpirifos

Aislado	Primer	Genero/ Especie relacionada según 16s RNAr	Relación Bases de datos	
			Numero de accesión	Porcentaje de similitud
BBC029	27F / 1492R	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	NR_114226.1	99%
BBC032	27F / 1492R	<i>Serratia fonticola</i>	KF054838	100%
BBC042	27F / 1492R	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU937368.1	99%

De acuerdo con los estudios realizados respecto a la remediación de suelos con clorpirifos, se han identificado un número considerable de microorganismos que utilizan este pesticida como fuente de carbono, las especies reportadas en estudios de degradación del clorpirifos son *Bacillus pumilus* C2A1 (Anwar et al., 2009), *Streptomyces chattanoogensis* cepa cgmc 4.1415, *Streptomyces olivochromogenes* cepa xsd08162 (Briceño et al. 2012), *Verticillium* sp. cepa dsp (fang et al. 2008) , *Serratia marcescens* (Cycoñ, 2013), *Alcaligenes* sp. jas1, *Enterobacter* sp. B-14, *Cupriavidus* sp. dt-1, *Klebsiella* sp. Cpk (Wang et al. 2013), Consorcio microbiano (Sasikala et al. 2012) (*Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Rhizobium* sp., *Comamonas aquatica*, *Staphylococcus hominis*, *Klebsiella* sp., *Aspergillus niger*, *Trichophyton* sp. y *Streptomyces radiopugnans*), *Aspergillus terreus* jas1. (Silambarasan y Abraham 2013), *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp., *Eurotium* sp., *Emericella* sp. (Maya et al. 2012), *Bacillus* sp., *Brevundimonas* sp (Singh et al. 2006), *Diaphorobacter* sp. gs-1 (Liang, Yang, Gong, Zhao, Zhang, Zhu et al., 2011), *Pseudomonas putida* F1 (Chanika et al. 2011), no obstante *Pseudomonas plecoglossicida* según Chaudhari et al. (2012) utiliza el tributil fosfato o fosfato de tributilo (TBP) un compuesto organofosforado como única fuente de carbono a diferentes concentraciones, lo que permite residir que *P. plecoglossicida* es capaz de tolerar compuestos organofosforados como el

clorpirifos y TBP.

Al considerar las especies mencionadas anteriormente podemos inferir el potencial y la viabilidad que tienen ciertos géneros y/o especies en la degradación de clorpirifos, las especies identificadas en este estudio (*Acinetobacter junii*, *Serratia fonticola*, *Pseudomonas plecoglossicida*) corroboran lo reportado en literatura, al pertenecer a los géneros de *Serratia sp*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, géneros que han sido ampliamente citados debido a que tienen la capacidad de utilizar diferentes compuestos organofosforados como única fuente de carbón y energía en diferentes sustratos, tanto en etapa de laboratorio como en campo Hernández-Ruiz (2017).

4.5 Evaluación de la Respuesta de los Microorganismos Seleccionados con Tolerancia al Contaminante bajo un Modelo en Condiciones de Invernadero

El ensayo realizado en condiciones de invernadero de los tratamientos propuestos se fundamentó en el crecimiento bacteriano en las horas 0, 24, 48, 192 y 360. El crecimiento describió una curva para cada tratamiento en relación con la adición del clorpirifos como se realiza en campo.

A continuación se muestra las curvas de crecimiento obtenidas para cada tratamiento, junto con sus respectivos controles.

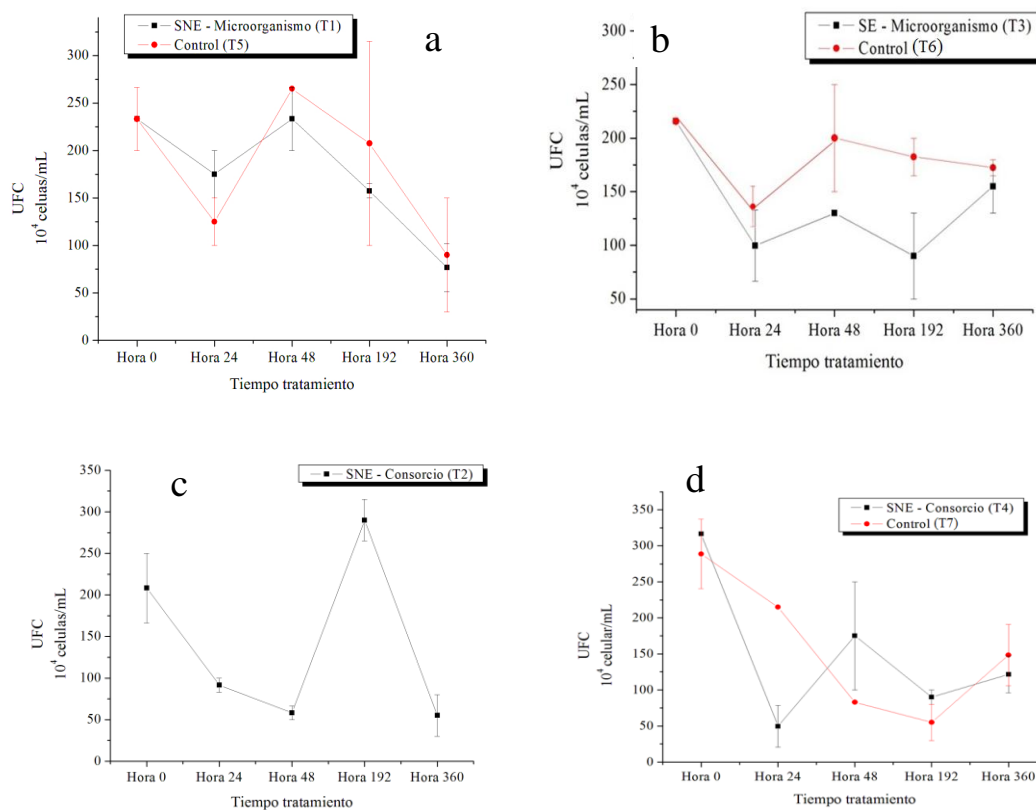


Figura 11. Crecimiento general de la población microbiana de los tratamientos con su respectivo control T1 y T5(a), T3 y T6 (b), T2 (c) y T4 y T7 (d), respecto al tiempo

De manera general, podemos apreciar en la figura 11 una curva de crecimiento con un comportamiento similar entre los tratamientos donde se inoculó el microorganismo y/o consorcio establecido para suelos estériles y no estériles (T1,T2,T3 Y T4), infiriendo que los microorganismos tienen una respuesta (asimilación) ante la adición del clorpirifos.

En la gráfica 11a apreciamos que el tratamiento T1 necesitó un periodo de 24 horas (periodo de estrés) para estabilizarse frente a la presencia del pesticida, reflejado en la reducción de la población bacteriana entre las 0 y 24 horas alrededor de un 40% ($144 \cdot 10^4$ UFC/mL), consecuentemente la población bacteria inició una etapa de crecimiento exponencial, asimilando el pesticida como fuente de carbono y energía, y a su vez utilizándola como nutriente para su

crecimiento, reflejado con el recuento más alto a las 48 horas del tratamiento ($233 \cdot 10^4$ UFC/mL). A partir de este punto, observamos un decrecimiento en la población bacteriana, hecho atribuible a la disminución del pesticida como sustrato de crecimiento. De la misma forma al observar la gráfica 11b, correspondiente al tratamiento T3, la población bacteriana también necesitó un periodo de adaptación (Hora 0 –hora 24) para poder asimilar el clorpirifos presente en el medio y utilizarlo como fuente de carbono, sin embargo, a diferencia del T1, el T3 no alcanzó a superar la población cero ($216 \cdot 10^4$ UFC/mL), por lo cual, luego del punto de inflexión (hora 24) el máximo crecimiento observado fue $130 \cdot 10^4$ UFC/mL (hora 48), esta tendencia contrasta con lo reportado por Cycoń (2013), quien afirma que, *S. marcescens* mostró un potencial de degradación superior en la hidrólisis de clorpirifos, en comparación con el potencial observado en suelos no esterilizados. Complementado, Cycoń (2013), concluyeron que la degradación de clorpirifos en medio mínimo mineral es mucho más rápida que en el suelo, siendo textura franca la mejor matriz para llevar a cabo la degradación de estos contaminantes. Este aspecto nos lleva a corroborar que la degradación de este compuesto organofosforado depende de algunos factores edáficos.

Con respecto a los tratamientos correspondientes al consorcio establecido (ver figura 11c y 11d) aunque presentaron un comportamiento donde la población bacteriana asimila el clorpirifos difiere en los tratamientos que solo se inoculó el microorganismo respectivamente. Los resultados muestran que la población bacteriana en el periodo de estrés se redujo hasta en un 80% ($270 \cdot 10^4$ UFC/ml). Sin embargo, al igual que los tratamientos T1 y T3 los tratamientos T2 Y T4, luego del periodo de estrés inician un periodo de asimilación del clorpirifos como fuente de carbono, de tal forma se logra un recuento de hasta $290 \cdot 10^4$ UFC/ml y $175 \cdot 10^4$ UFC/ml para T2 Y T4 respectivamente. Resaltamos el hecho que para T2 el periodo de transición o estrés requirió

24 horas más que lo otros tratamientos aplicados (ver figura 5c), sin embargo, luego de la hora 48 se inicia un periodo de crecimiento exponencial (hasta $290 \cdot 10^4$ UFC/ml) igual que los otros tratamientos.

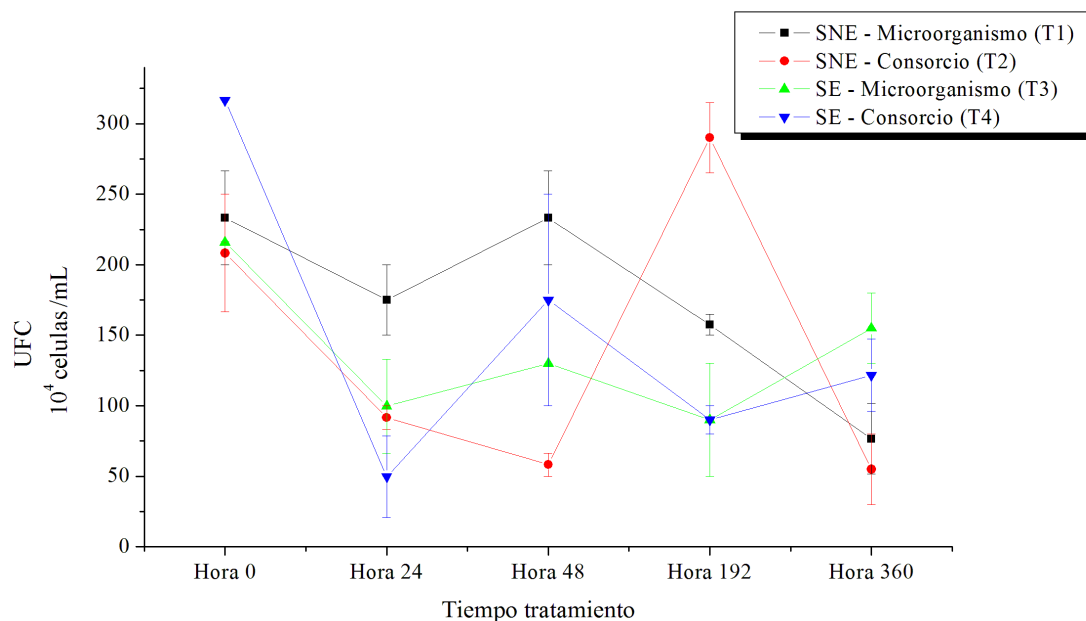


Figura 12. Crecimiento general de la población microbiana de los tratamientos T1, T2, T3 y T4 respecto al tiempo

La anterior gráfica nos permite establecer una comparación puntual de los tratamientos aplicados a lo largo del periodo de evaluación. Se corrobora lo expresado anteriormente, todos los tratamientos muestran un comportamiento de transición o estrés, periodo que va desde la hora cero hasta la hora 24, excepto para T2 que se extendió hasta la hora 48. Del mismo modo se establece el crecimiento exponencial durante las próximas 24 horas, alcanzado su crecimiento máximo para todos los tratamientos y posterior decrecimiento bacteriano. La asimilación (degradación) del clorpirifos en el estudio (hora 24 –hora 48) para los tratamientos se llevó a cabo por hidrólisis rápida en su metabolito primario 3, 5,6-tricloro-2-piridinol (TCP). Este es persistente en el ambiente y su vida media es de 42 a 49 días (Liang et al., 2011). El TCP es más

móvil que la molécula parental debido a su mayor solubilidad en agua, lo cual causa la contaminación generalizada de ambientes acuáticos y suelos (Silambarasan & Abraham 2013). En consecuencia, la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. lo ha listado como un contaminante persistente (Luet, 2013). Anwar et al. (2009) y Lu et al. (2013) afirman que el TCP muestra altos efectos antimicrobianos, lo que impide su propia degradación por microorganismos. En este estudio se determinó que el clorpirifos es asimilado (degradado) tanto para los tratamientos con el microorganismo establecido *S. fonticola* (T1 y T3), y el consorcio compuesto por *P. plecoglossicida* *S. fonticola* *A. hydrophila* (T2 y T4). El compuesto de la degradación primaria (TCP) del clorpirifos en altas concentraciones, suprime el crecimiento microbiano, infiriendo que los tratamientos en estudio fueron capaces de tolerar compuestos organofosforados como su metabolito de la degradación primara como se ve reflejado en las curvas de crecimiento (ver figura 5). Autores como Anwar et al. (2009), Briceño et al. (2012), Lu et al. (2013), Silambarasan & Abraham (2013) han reportado la degradación de TCP por algunos microorganismos como *B. pumilus*, *Streptomyces chattanoogensis*, *Alcaligenes* sp., *Cupriavidus* sp., *Aspergillus terreus* y un consorcio formado por *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Eurotium*sp. y *Emericella* sp.

4.5.1 Análisis estadístico. El análisis estadístico implementado permitió manejar los valores obtenidos en el recuento (UFC/mL) durante el tiempo de tratamiento, del mismo modo estos fueron sometidos a pruebas estadísticas para evaluar si la aplicación de los tratamientos afectan directamente el crecimiento microbiano.

En este sentido se realizó una estadística de los cinco tiempos evaluados en el ensayo, siendo el tiempo hora 0 un tiempo de referencia el cual no implica respuesta al ensayo. La tabla 13 representa de manera general los análisis estadísticos del ensayo en etapa de invernadero,

describiendo la ANOVA unifactorial de las medias respecto a las horas evaluadas en el ensayo y la prueba post-hoc realizada para los análisis estadísticos respectivamente, agrupados en dos subconjuntos, donde el primer subconjunto agrupa los tratamientos con mayor índice de significancia entre los otros tratamientos ($\alpha=0,05$) (ver anexo 7 y figura 13).

ANOVA	HORA 0		HORA 24					HORA 48				HORA 192			HORA 360					
	F	Sig.	F		Sig.			F		Sig.		F		Sig.		F		Sig.		
	5,772	0,003	52,341		0,000			13,291		0,000		9,456		0,000		5,127		0,006		
	Sub. 1	Sub. 2	Sub. 1	Sub. 2	Sub. 3	Sub. 4	Sub. 5	Sub. 1	Sub. 2	Sub. 3	Sub. 4	Sub. 1	Sub. 2	Sub. 3	Sub. 1	Sub. 2	Sub. 3	Sub. 1	Sub. 2	Sub. 3
T 1	233,25	233,25	-	-	175,0	175,0	-	-	-	-	233,25	157,5	157,5	-	76,67	76,67	-	-	-	-
T 2	208,25	-	91,50	91,50	-	-	-	58,25	-	-	-	0	0	290,0	55,00	-	-	-	-	-
T 3	215,75	-	99,75	99,75	-	-	-	130,0	130,0	130,0	-	90,00	90,00	-	-	155,0	155,0	0	0	0
T 4	-	316,50	49,6	-	-	-	-	-	175,0	175,0	175,0	90,00	90,00	-	121,6	121,6	121,6	7	7	7
T 5	233,25	233,25	-	125,0	125,0	-	-	-	-	-	265,0	-	207,5	207,5	90,00	90,00	90,00	0	0	0
T 6	215,75	-	-	0	0	-	340,7	-	-	200,0	200,0	182,5	182,5	182,5	-	-	172,5	5	5	0
T 7	288,67	288,67	-	-	-	215,0	-	83,00	83,00	-	-	55,00	-	-	148,3	148,3	148,3	3	3	3
Sig.	0,63	0,51	0,193	0,598	0,194	0,408	1,00	0,263	0,088	0,286	0,099	0,052	0,084	0,131	0,053	0,135	0,105			

subconjuntos para alfa = 0,05
 ** Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos
 *** Comparación de medias mediante el Test HSD Tukey ^a

Figura 13. Análisis estadístico de los momentos evaluados en el ensayo etapa de invernadero involucrando los tratamientos del ensayos

Al realizar la prueba de normalidad de los datos, para la hora cero, con el estadísticos de Shapiro – Wik, inferimos que los datos presentan normalidad de varianza ($\alpha=0,05$). Del mismo modo se colocó a prueba el supuesto de la homogeneidad en los datos experimentales utilizando el contraste de Levene, el resultado de la prueba fue que los datos no presentan homogeneidad en sus varianzas ($\alpha=0,05$) (Anexo 7, tabla 14). Posteriormente se realizó un ANOVA unifactorial para la hora cero (Anexo 7, tabla 15), donde podemos establecer diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre los tratamiento. La prueba post-hoc realizada para la hora cero (Anexo 7, tabla 16)

nos permitió identificar cuales tratamientos difieren entre sí, en ese sentido, el tratamiento T4 estadísticamente difiere de los tratamientos T2 y T3 ($\alpha=0,05$) agrupados en el subconjunto 1, pero no del tratamiento T1, agrupado en el subconjunto 2.

La realizar la prueba de normalidad de los datos, para la hora 24 (Anexo 7, tabla 17), con el estadísticos de Shapiro – Wik, inferimos que los datos presentan normalidad de varianza ($\alpha=0,05$). Del mismo modo se colocó a prueba el supuesto de la homogeneidad en los datos experimentales utilizando el contraste de Levene, los datos presentan homogeneidad en sus varianzas ($\alpha=0,05$) (Anexo 7, tabla 18). Posteriormente se realizó un ANOVA unifactorial para la hora 24 (Anexo 7, tabla 19), donde podemos establecer diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las medias de los tratamiento. La prueba post-hoc realizada para la hora 24 (Anexo 7, tabla 20) nos permitió identificar cuales tratamientos difieren entre sí, en ese sentido, el tratamiento T1 (agrupado en el subconjunto 2) difiere estadísticamente de los tratamientos T2, T3 y T4 ($\alpha=0,05$) agrupados en el subconjunto 1, sin embargo, el tratamiento T1 no presenta diferencias significativas ($\alpha=0,05$) con su control (T5), ya que están agrupados en el mismo subconjunto.

Los análisis estadísticos para la hora 48 (Anexo 7, tabla 21), con el estadísticos de Shapiro – Wik, inferimos que los datos presentan normalidad de varianza ($\alpha=0,05$). Del mismo modo se colocó a prueba el supuesto de la homogeneidad de varianza en los datos experimentales utilizando el contraste de Levene, el resultado de la prueba fue que los datos presentan homogeneidad en sus varianzas ($\alpha=0,05$) (Anexo 7, tabla 22). Posteriormente se realizó un ANOVA unifactorial para la hora 48 (Anexo 7, tabla 23), donde podemos establecer diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las medias de los tratamiento. La prueba post-hoc realizada para la hora 48(Anexo 7, tabla 24) permitió identificar cuales tratamientos difieren entre sí, en ese sentido, los tratamiento T2, T3 y T4 estadísticamente no difiere entre sí ($\alpha=0,05$), agrupados en

los subconjuntos 1,2 y 3. Contrastando lo anterior, el tratamiento T1 agrupado en el subconjunto 4 difiere significativamente ($\alpha=0,05$) de los tratamientos T2 y T3, pero no del T4. Finalmente inferimos estadísticamente que el tratamiento T1 no presenta diferencias significativas con su tratamiento control T5 ($\alpha=0,05$), ambos agrupados en el subconjunto 4.

Los análisis estadísticos para la hora 192 (Anexo 7, tabla 25), con el estadísticos de Shapiro – Wik, inferimos que los datos presentan normalidad de varianza ($\alpha=0,05$). Del mismo modo se colocó a prueba el supuesto de la homogeneidad de varianza en los datos experimentales utilizando el contraste de Levene, el resultado de la prueba fue que los datos presentan homogeneidad en sus varianzas ($\alpha=0,05$) (Anexo 7, tabla 26). Posteriormente se realizó un ANOVA unifactorial para la hora 192 (Anexo 7, tabla 27), donde podemos establecer diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las medias de los tratamiento. La prueba post-hoc realizada (Anexo 7, tabla 28) permitió identificar cuales tratamientos difieren entre sí, en ese sentido, los tratamiento T1, T3 y T4 estadísticamente no difiere entre sí ($\alpha=0,05$), agrupados en los subconjuntos 1, sin embargo, el tratamiento T2 agrupado en el subconjunto 3 difiere significativamente ($\alpha=0,05$) de los demás tratamientos. Aun así, estadísticamente no podemos comprobar si existe o no diferencias significativas con su tratamiento control.

Los análisis estadísticos para la hora 360 (Anexo 7, tabla 29), con el estadísticos de Shapiro – Wik, nos permitió inferir que los datos presentan normalidad de varianza ($\alpha=0,05$). Del mismo modo se colocó a prueba el supuesto de la homogeneidad de varianza en los datos experimentales utilizando el contraste de Levene, el resultado de la prueba fue que los datos presentan homogeneidad en sus varianzas ($\alpha=0,05$) (Anexo 7, tabla 30). Posteriormente se realizó un ANOVA unifactorial para la hora 360 (Anexo 7, tabla 31), donde podemos establecer diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las medias de los tratamiento. La prueba post-hoc realizada (Anexo

7, tabla 32) permitió identificar cuales tratamientos difieren entre sí, en ese sentido, el grupos de tratamientos T1 y T2 difieren significativamente del grupo de tratamiento T3 Y T4 ($\alpha=0,05$), agrupados en los subconjuntos 1 y 3 respectivamente, sin embargo, no existe ninguna diferencia significativa entre las medias de esos grupos ($\alpha=0,05$). Finalmente los tratamientos T3 y T4 agrupados en el subconjunto 3 no presentan diferencias significativas con sus tratamientos control ($\alpha=0,05$), agrupados en el mismo subconjunto.

5. Conclusiones

El uso de microorganismos utilizando el clorpirifos como única fuente de carbono y energía a nivel de laboratorio y en aplicaciones bajo condiciones de invernadero, nos permitió plantear las siguientes conclusiones:

Las características fisicoquímicas de las muestras de suelos arroceros de Norte de Santander, influyen en gran medida en la distribución de las poblaciones bacterianas de este tipo de suelos.

El 18% de los aislamientos microbianos obtenidos permitieron ser destacados como tolerantes a altas concentraciones de clorpirifos (1200mg/L), además de usar el pesticida como fuente de carbono y energía, implicando la posible participación de los aislados en la degradación del contaminante.

Los suelos arroceros estudiados tienen la capacidad de aprovechar el clorpirifos asimilándolo como fuente de carbono y energía, permitiendo y sus productos secundarios, así como las propiedades edáficas son una variable a considerar en la implementación de un posible tratamiento biológico.

El aislamiento BBC042, identificado molecularmente como perteneciente a la especie *Aeromonas hydrophila*, actualmente no se encuentra reportado como microorganismo degradador del pesticida clorpirifos ni otros compuestos organofosforados.

El comportamiento de los tratamientos evaluados en la etapa de invernadero presenta similitud con la conducta observada por dichos aislamientos en la etapa *in-vitro*.

Referencias Bibliográficas

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (1997). *Reseña Toxicológica del Clorpirifos*. Atlanta: ATSDR.
- Alexandratos, N. (1999). World food and agriculture: outlook for the medium and longer term. *Revista Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4(96), 5908-5914.
- Anuja, G. (2005). Isolation, screening and selection of efficient chlorpyrifos degrading microorganisms. Tesis Master of Science (Agriculture) in Agricultural Microbiology. University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Anwar, S., Liaquat, F., Khan, Q., Khalid, Z. & Iqbal, S. (2009). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *J Hazard Mater*, 168(1), 400-405.
- Araujo, I., Angulo, N., Cardenas, C., Méndez, M., Morante, M. & Machado, M. (2004). Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38(3), 1-15.
- Bass, D., Hastings, N. & Brown, R. (2000). Performance of air sparging systems: a review of case studies. *Journal of Hazardous Materials*, 4(72), 101-119.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 4(543), 251-272.
- Boopathy R. (2004). Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study. *Bioresource Technol*, 4(94), 143-151.

- Brady, N. (1990). *The nature and properties of soils*. New York, USA: Prentice-Hall.
- Briceño, G., Fuentes, M., Palma, G., Jonquera, A., Amoroso, M. & Diez, M. (2012). Chlorpyrifos biodegradation and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil. *Int Biodeterior Biodegradation*, 4(73), 1-7.
- Brissio P. (2005). *Evaluación preliminar del estado de contaminación en suelos de la provincia del Neuquén donde se efectúan actividades de explotación hidrocarburífera*. Tesis de grado. Universidad Nacional del Comahue. Buenos Aires, Argentina.
- Chanika, E., Georgiadou, D., Soueref, E., Karas, P., Karanasios, E., Tsiropoulos, N., et al., (2011). Isolation of soil bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticides. *Bioresour Technol*, 102(3), 3184-3192.
- Chaudhari, T., Melo, J., Fulekar, M., & D'Souza, S. (2012). Tributyl phosphate degradation in batch and continuous processes using *Pseudomonas pseudoalcaligenes* MHF ENV. *Int Biodeterior Biodegradation*, 2(74), 87-92.
- Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. (1998). *Catálogo oficial de plaguicidas*. México: CICOPLAFEST.
- Conant, J. (2005). *Los plaguicidas son un veneno*. Recuperado de: <http://www.corpoica.org.co>
- Cremlyn, R. (1979). *Pesticides, Preparation and Mode of Action*. New York: John Wiley & Sons, 360.
- Domde, P., Kapley, A. & Purohit, H. (2007). Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environmental Science*

and Pollution Research, 2(14), 7-11.

Environmental Protection Agency. (1994). *Chapter III: Bioventing. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers*. Washington, DC: EPA.

Environmental Protection Agency. (2010). *Chlorpyrifos-methyl Summary Document Registration Review: Initial Docket March 2010. Docket Number: EPA-HQ-OPP-2010-0119*. Washington, DC: EPA.

Escobal, L. & Josefina, D. (2005). *Caracterización de suelos contaminados con plaguicidas organoclorados, para su biorremediación*. Recuperado de:
<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico2005/escobar.pdf>

Fang, H., Qin Xiang, Y., Jie Hao, Y., Qiang Chu, X., Dong Pan, X., Quan Yu, J., et al., (2008). Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. dsp in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *Int Biodeterior Biodegradation*, 61(4), 294-303.

Fernández, J., Ferrando, L., Macazaga, V. & Fernández, A. (2005). Diversidad de bacterias endófitas en cultivos de arroz en Uruguay: estudios preliminares. *Agrociencia*, 9(1-2), 285-290.

Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales Sis San Navarra*, 26(1), 1-12. Recuperado de:
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113766272003002200009&lng=es&nrm=iso

- Galli, C. (2002). *Degradación por medios bacterianos de compuestos químicos tóxicos*. Buenos Aires: Comisión Técnica Asesora en: Ambiente y Desarrollo Sostenible.
- Gentry, J., Rensing, C. & Pepper, I. (2004). New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34(2), 447-494.
- Gilden, R., Huffling, K. & Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 39(1), 103–10.
- Grant, R., Daniell, T. & Betts, W. (2002). Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria. *J. Appl. Microbiol*, 4(92), 115-534.
- Gray, H. (1965). Dursban a new organophosphorus insecticide. *Down to Earth*, 21(3), 26-27.
Recuperado de: <https://eurekamag.com/research/024/517/024517623.php>
- Hernández, G. (2017). Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. *Corpoica Ciencia Tecnológica Agropecuaria*, 18(1), 139-159.
Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n1/v18n1a09.pdf>
- Hua, F., Yue Q., Yi J., Xiao, Q., Xue, D. & Pana, J. (2008). Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 294-303.
- Huerta, H. (2010). *Determinación de propiedades físicas y químicas de suelos con mercurio en la región de san Joaquín, Qro., y su relación con el crecimiento bacteriano*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Instituto Colombiano Agropecuario. (2010). *Registros de venta de plaguicidas químicos de uso agrícola*. Bogotá: ICA.

Instituto Nacional de Ecología. (2004). *Publicaciones*. Recuperado de:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/448/9.pdf>

Instituto Nacional de Ecología. (2007). *Publicaciones*. Recuperado de:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/459/cap4.html>

Instituto Nacional de Ecología. (2016). *Publicaciones*. Recuperado de:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/459/cap1.html>

Instituto Nacional de Estadística. (2010). *Estado Zulia*. Caracas: INE.

Iwamoto, T. & Nasu, M. (2001). Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(1), 1-8.

Jiang, X., Zeng, G., Huang, D., Chen, Y., Liu, F., Huang, G., et al., (2006). Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 4(22), 909-913.

Jilani, S. & Altaf, M. (2006). Biodegradation of Cypermethrin by *Pseudomonas* in a batch activated sludge process. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 3(4), 371-380.

Jiménez, L., Quilodrán, J., Miranda, J. & Rodríguez, H. (2008). Efecto de dosis única intraperitoneal de cipermetrina en la corteza cerebral somato sensorial de ratones. *International J. Morphology*, 6(1), 19-26.

- Jizhong, Z., Beicheng, X., David, T., Wu, L., Terry, M., Neill, R., et al., (2001). *Spatial and resource Factors Influencing High Microbial Diversity in soil. Environmental Sciences Division*. Michigan: Center for Microbial Ecology.
- Jorgensen, K., Puustinen, J. & Sourtti, A. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by composting in biopiles. *Environ*, 4(107), 245–254.
- Journal of Pesticide Reform. (1996). *Northwest coalition for alternatives to pesticides/ncap*.
Recuperado de:
<https://d3n8a8pro7vhmx.cloudfront.net/ncap/pages/26/attachments/original/1428423381/glyphosate.pdf>
- Juhler, R. (1998). Supercritical fluid extraction of pesticides from meat: a systematic approach for optimisation. *Revista Analyst*, 2(123), 1551-1556.
- Kaczewer, J. (2003). *Uso de agroquímicos en las fumigaciones periurbanas y su efecto nocivo sobre la salud humana*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Kaplan, C. & Kitts, C. (2004). Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(11), 5625-5633.
- Karpouzas, D. & Walker, A. (2000). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epI to degrade ethoprophos in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 3(32), 1753-1762.
- Kim, D., Heo, G. & Lee, D. (1998). Determination of organophosphorus pesticides in wheat flour by supercritical fluid extraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr*, 8(824), 63-70.

- Kuhn, T., Hamonts, K., Dijk, J., Kalka, H., Stichler, W., Springael, D. et al., (2009). Assessment of the intrinsic bioremediation capacity of an eutrophic river sediment polluted by discharging chlorinated aliphatic hydrocarbons: A compound-specific isotope approach. *Environ. SciTechnol*, 2(43), 5263-5269.
- Kylin, H. & Siödin, A. (2003). Accumulation of airborne hexachlorocyclohexanes and DDT in Pine Needles. *Environ. SciTechnol*, 1(37), 2350-2355.
- Lang, Q. & Wai, C. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. *Talanta* 53(3), 771–782.
- Leahy, J. & Colwell, R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 2(54), 305-315.
- Lee, S., Lee, S., Kim, D. & Kim, J. (2007). Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 1(143), 65-72.
- Li, F., Li, X., Zhou, S., Zhuang, L., Cao, F., Huang, D., et al., (2010). Enhanced reductive dechlorination of DDT in an anaerobic system of dissimilatory iron-reducing bacteria and iron oxide. *Environmental Pollution*, 4(158), 1733-1740.
- Li, G., Jian, J., Xiao, L., Waseem, S. & Shun, L. (2007). Biodegradation of Ethametsulfuron-Methyl by *Pseudomonas* sp. SW4 Isolated from Contaminated Soil. *Curr Microbiol*, 55(1), 420-426.
- Li, J. & Chen, B. (2009). Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Materials*, 12(2), 76-94.

- Li, K., Wang, S., Shi, Y., Qu, J., Zhai, Y. & Xu, L. (2011). Genome sequence of *Paracoccus* sp. Strain TRP, a Chlorpyrifos Biodegrader. *J Bacteriol*, 193(7), 6-7.
- Li, X., Jiang, J., Gu, L., Ali, S., He, J. & Li, S. (2008). Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples. *Int Biodeterior Biodegradation*, 62(4), 331-335.
- Liang, B., Yang, C., Gong, M., Zhao, Y., Zhang, J., Zhu, C., et al., (2011). Adsorption and degradation of triazophos, chlorpyrifos and their main hydrolytic metabolites in paddy soil from Chaohu Lake, China. *J Environ Manage*, 92(9), 2229-2234.
- Lianos, C. & Kjoller, A. (1976). Changes in the flora of soil fungi following oil waste application. *Oikos*, 3(27), 377-382.
- Litchfield, C. (2005). Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime? *BioScience*, 4(55) 273-279.
- Liu, W., Gan, J., Lee, S. & Werner, I. (2005). Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of bifenthrin and permethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(8), 1861-1866.
- Loaiza, A. (2005). *Lineamientos de políticas sobre uso y manejo mesurado de plaguicidas con énfasis en el sector agropecuario y forestal del departamento de Antioquia*. Medellín: CEIBA.
- López, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S. & García, J. (2006). *Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo*. Programa de Ciencias Básicas. Tesis de grado. Universidad de La Salle. Bogota, Colombia.

- Lu, P., Li, Q., Liu, H., Feng, Z., Yan, X., Hong, Q., et al., (2013). Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. dt-1. *Bioresour Technol*, 4(127), 337-342.
- Lundmark, C. (2002). Breakthroughs in bioremediation. *BioScience*, 52(12), 1156.
- Ma, Y., Zhang, J. & Wong, M. (2003). Microbial activity during composting of anthracenecontaminated soil. *Chemosphere*, 2(52), 1505-1513.
- Maier, R. & Soberon, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipidos: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1(54), 625-623.
- Malik, D., Singh, M. & Bhatia, P. (2009). Biodegradation of Cypermethrin by a *Pseudomonas* Strain Cyp19 and its use in Bioremediation of contaminated soil. *The Internet Journal of Microbiology*, 6(2), 1-15.
- Mallick, K., Bharati, K., Banerji, A., Shakil, N. & Sethunathan, N, (1999). Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(2), 48-54.
- Mansour S. (2004). Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicology*, 4(198), 91-115.
- Marchal, R., Pene, S., Solano, F. & Vandecasteele, J. (2003). Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology*, 2(58), 441-448.
- Marin, L. & Jaramillo, B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 179-185. Recuperado de:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182015000200010&lng=es

&nrm=iso

- Martínez, A., Osorio, A., Pérez, M., Pinto, J. & Gurrola, B. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 2(12), 1-15. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37020226009>
- Martínez, C. & Gómez, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(4), 185-200. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992007000400004&lng=es&nrm=iso
- Matsumura, F. & Krishna, C. (1982). *Biodegradation of pesticides*. New York: Plenum Press.
- Medina, M., Barata C., Telfer, T. & Baird, D. (2004). Effects of cypermethrin on marine plankton communities: a simulated field study using mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1(58), 236–245.
- Meek, B., Rechel, E., Carter, L. & DeTar, W. (1992). Bulk Density of a Sandy Loam: Traffic, Tillage, and Irrigation-Method Effects. *Soil Science Society of America Journal* 56(2):562-565
- Mejía, G., Salvador, M. & Adriano, M. (2005). Selección de microorganismos que degradan paraquat. *Ciencia y Tecnología en la Frontera*, 1(2), 1-15.
- Mendoza, J., Perea, Y., Salvador, J., Morales J. & Pérez, G. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2(3),

45-55.

Mihopoulos, P., Suidan, M., Sayles, G. & Kaskassian, S. (2002). Numerical modeling of oxygen exclusion experiments of anaerobic bioventing. *Journal of Contaminant Hydrology* 58(4), 209–220.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2005). *Observatorio agro cadenas Colombia. La cadena de la papa en colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005*. Recuperado de:

www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112163731_caracterizacion_papa.pdf

Ministerio de Agricultura. (2011). *La Cadena Agroalimentaria de la papa en Colombia*. Recuperado de: <http://www.minagricultura.gov.co>

Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (2007). *Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible. Uso aparente de plaguicidas en Colombia durante los años 2004 – 2007*. Recuperado de: https://quimicos.minambiente.gov.co/wp-content/uploads/2021/05/Inventario_PlaguicidasCOP_2007.pdf

Ministerio de Ambiente, Vivienda, y Desarrollo Territorial. (2004). *Guía ambiental para el cultivo de la papa*. Recuperado de: <http://www.siame.gov.co>

Mohamad, F., Abdul, R., Bakar, A. & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 4(2), 61-67.

Molinari, M. (2011). *Sistema Munsell*. [molinaripixel.com.ar](http://www.molinaripixel.com.ar). Recuperado de: <http://www.molinaripixel.com.ar/2011/08/01/el-sistema-munsell-como-herramienta-fotografica/>

- Mrozik, A., Labuzek, S. & Piotrowska, Z. (2005). Changes in fatty acid composition in *Pseudomonasputida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. *Microbiological Research*, 2(160), 149-157.
- Mukherjee, I. & Gopal, M. (1996). Degradation of chlorpyrifos by two soil fungi *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4(37), 145-151.
- Mukherjee, I., Gopal, M. & Dhar, D. (2004). Disappearance of chlorpyrifos from cultures of *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1(73), 358-363.
- Murcia, M. & Stashenko, E. (2008). Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Revista Agrosur*, 36(2), 71-81.
- Murugesan, A., Jeyasanthi, T. & Maheswari, S. (2010). Isolation and characterization of cypermethrin utilizing bacteria from Brinjal cultivated soil. *African Journal of Microbiology Research*, 4(1), 10-13.
- Nápoles, J. & Rodríguez, A. (2007). *Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos*. Recuperado de:
<http://monografias.uo.edu.cu/index.php/monografias/article/view/4/6>
- Narváez, S. (2005). *Selección de bacterias aisladas de sedimentos del Caribe colombiano con capacidad degradadora de hidrocarburos*. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- National Institutes of Health. (1978). *Bioassays of DDT, TDE and p,p-DDE for possible carcinogenicity*. Bethesda, Maryland: National Institutes of Health.

- Niazi, A. & Goodarzi, M. (2008). Orthogonal signal correction–partial least squares method for simultaneous spectrophotometric determination of cypermethrin and tetramethrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 69(4), 1165–1169.
- Olguín, E., Hernández, M. & Sánchez, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(3), 1-15.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2020). *Plaguicidas*. Recuperado de: <http://www.fao.org/kids/es/pesticides.html>
- Orozco, C., Pérez, A., González, M., Rodríguez, F. & Alfayate, J. (2004). *Contaminación ambiental: una visión desde la química*. Madrid: Thomson.
- Ostiz, S. & Khan, S. (1994). Nonextractable (bound). Residues of cypermethrin in soils. *Bull Environ Contam Toxicol*, 4(53), 907-912.
- Pacheco, A. (2006). *Uso de plaguicidas y exigencias del mercado agroalimentario*. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario.
- Paoletti, M. & Pimentel, D. (2000). Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 12(3), 279-303.
- Papale, S. (2003). *Plaguicidas ¿Venenos útiles?* Fundación Nueva Tierra. Recuperado de: [www./ecoportal.net](http://www.ecoportal.net).

- Parales, R. & Harwood, C. (2002). Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 266-73.
- Pathak, H., Kantharia, D., Malpani, A. & Madamwar, D. (2009). Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: In vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms. *Journal of Hazardous Materials*, 4(166), 1466–1473.
- Penberthy, J. & Weston, R. (2000). Remediation of diesel and fuel oil hydrocarbons in high clay content soil. A field comparison of amendment performance conducted at the Mare Island Naval Shipyard, Proceedings of the National Defense Industrial. *Association*, 4(2), 27-30.
- Peña, L. & Lucero, A (2003). *Manejo integrado de chisas en el departamento de Nariño*. San Juan de Pasto: Corpoica.
- Pino, N. & Peñuela, G. (2011). Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(2), 827-831.
- Piña, O. (2012). *Lavado In Situ de un suelo contaminado con diesel, asistido con surfactantes*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Bogota, Colombia.
- Porta, J., Lopez, M. & Roquero, C. (1994). *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Madrid: Mundi Prensa.
- Prince, R. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 4(19), 117-242.

- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2007). *Informe anual del PNUMA, Perspectivas del Medio Ambiente Mundial*. Recuperado de:
[http://www.pnuma.org/deat1/Policy%20Briefs/Espanol/Brief_Areasprotegidas_biodiversidad \(webpags\).pdf](http://www.pnuma.org/deat1/Policy%20Briefs/Espanol/Brief_Areasprotegidas_biodiversidad(webpags).pdf)
- Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. (1993). *Guía para la salud y la seguridad N° 22*. Recuperado de: <http://cidbimena.desastres.hn/pdf/spa/doc10760/doc10760-contenido.pdf>
- Quintero, J., Moreira, M, Lema, J. & Feijoo, G. (2006). An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. *Chemosphere*, 4(63), 1005-1013.
- Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (2014). *Plaguicidas con Prontuario*. Recuperado de: http://www.rap-al.org/articulos_files/Carbofurano_Enlace_83.pdf
- Ríos, L. & Vélez, M. (2008). *Vulnerabilidad a la contaminación, zona sur acuífero del Valle del Cauca, Colombia*. Medellín: Boletín de Ciencias de la Tierra.
- Riser, E. (1998). *Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological*. Madrid: Lewis
- Rivera Y. & Dendooven, L. (2004). Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. *Chemosphere*, 2(54), 379-386.
- Roane, T., Josephson, K. & Pepper, L. (2001). Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. *Applied Environmental Microbiology*, 67(2), 3208-3215.

- Roberts, T. & Standen, M. (1981). Further-studies of the degradation of the pyrethroid insecticide cypermethrin in soils. *Revista Pesticide Science*, 2(12), 285–296.
- Rockne, K., Chee, J., Sanford, R., Brian, P., James, T. & Staley and S. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1595-1601.
- Rodrigues, M., Reyes, F., Rehder, V. & Rath, S. (2005). An SPME–GC–MS Method for Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Medicinal Plant Infusions. *Revista Chromatographia*, 61(6), 291–297.
- Rodríguez, K. (2005). *Eficacia del hongo Pleurotus ostreatus como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados*. Tesis de grado. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico.
- Ros, M., Goberna, M., Moreno, J., Hernández, T., García, C., Insam, H. & Pascual, J. (2006). Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. *Appl. Soil Ecol*, 1(34), 93-102.
- Rucks, L., García, F., Kaplán, A., Ponce, J. & Hill, M. (2004). *Propiedades físicas del suelo*. Recuperado de: <http://bibliofagro.pbworks.com/f/propiedades+fisicas+del+suelo.pdf>
- Ryan, J., Oler, R. & Rucker, E. (1991). Biorremediation of Organic Contaminated Soils. *Journal of Hazardous Materials*, 4(28), 159-169.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Sánchez, M. & Sánchez, M. (2013). *Los plaguicidas: adsorción y evolución en el suelo*.

Recuperado de: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf%3B>

Sánchez, M., Mondini, C., Cayuela, M., Roig, A., Conti, M. & Nobili, M. (2008). Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly tilled soils. *Biology and Fertility of Soils*, 1(44), 885-890.

Sasikala C, Jiwal S, Rout P. & Ramya M. (2012). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. *World J Microbiol Biotechnol*, 28(3), 1301-1308.

Saval, S. (1997). Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. *Ingeniería y Ciencias Ambientales*, 2(1), 1-33.

Schafer, J., Glass, T., Bressler, J., Todd, C. & Schwartz, B. (2005). Blood lead is a predictor of homocysteine levels in a population-based study of older adults. *Environ. Health Perspect*, 4(113), 1-5.

Schwarz, J., Walker, J. & Colwell, R. (1975). Deep-sea bacteria: growth and utilization of n-hexadecane at in situ temperature and pressure. *Canadian Journal of Microbiology*, 1(21), 682-687.

Scragg, A. (2002). *Biotecnología medioambiental*. Zaragoza: Acribia.

Shukla, K. P., Singh, N. & Sharma, S. (2010). Bioremediation: Developments, Current Practices and Perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 4(2), 1-18.

Sierra, B., Lancellotti, C., Angelus, M. & Vidal, I. (2007). Azufre Elemental como Corrector del pH y la Fertilidad de Alfucos Suelos de la III y IV Región de Chile. *Agricultura Técnica*,

67(2), 173-181. <https://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072007000200007>

- Silambarasan S. & Abraham J. (2013). Kinetic studies on enhancement of degradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP by a newly isolated *Alcaligenes* sp. jas1. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(3), 438-445.
- Silambarasan, S. & Abraham J. (2012). Ecofriendly method for bioremediation of chlorpyrifos from agricultural soil by novel fungus *Aspergillus terreus* jas1. *Water Air Soil Pollut*, 2(1), 224-369.
- Silva, S. & Correa, F. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. *Semestre Económico*, 12(23), 13-34.
- Singh, B., Walker, A. & Wright, D. (2006). Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: influence of different environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(38), 2682–2693.
- Singh, B., Walker, A., Denis, J. & Wright, D. (2003). Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: influence of different environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(38), 2682–2693.
- Singh, B., Walker, A., Morgan, J. & Wright, D. (2004). Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 4(70), 4855-4863.
- Singh, S., Hyun, S., Mulchandani, A. & Chen, W. (2008). Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 2(19), 437-444.

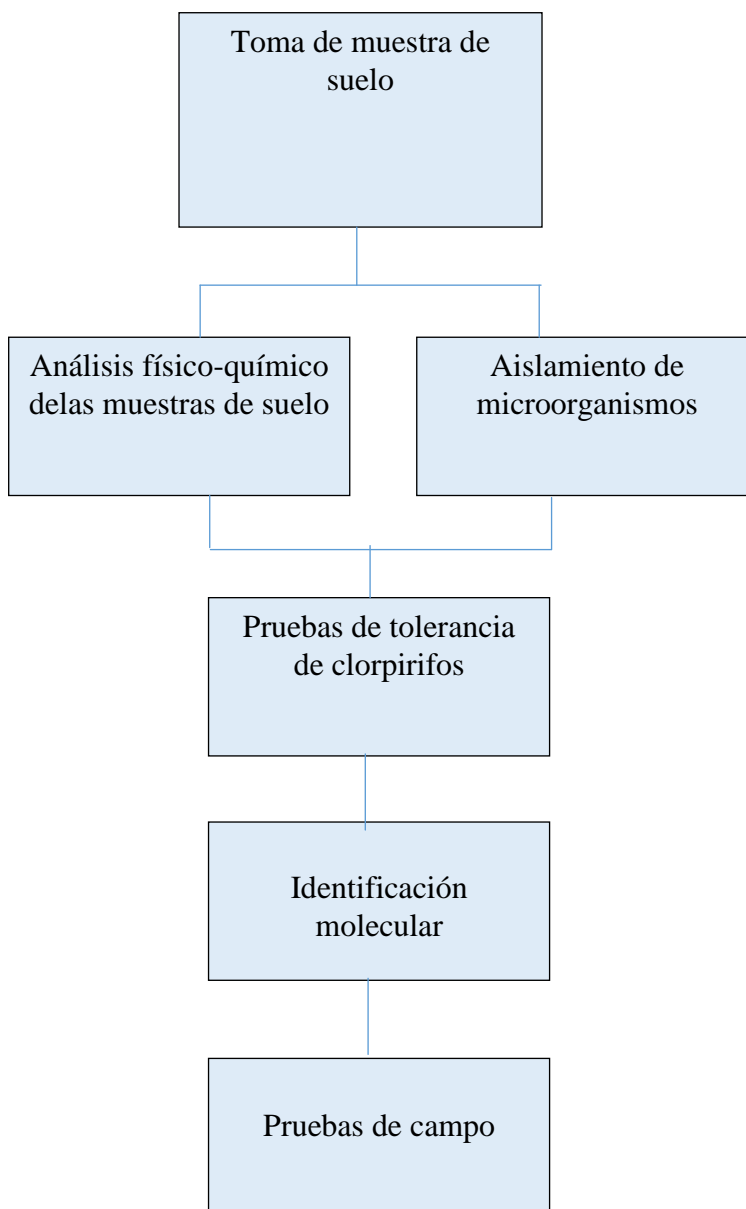
- Solanas, A. (2009). *La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Estudios en la Zona no Saturada del Suelo*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Solano, A. (2005). *Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Song, X. & Seagren, E. (2008). In Situ Bioremediation in Heterogeneous Porous Media: Dispersion-Limited Scenario. *Environmental Science & Technology*, 3(42), 6131-6140.
- Sonkong, K., Prasertsan, P., & Sobhon, V. (2008). Screening and identification of p,p-DDT degrading soil isolates. *Journal of Science and Technology*, 2(30), 103-110.
- Spark, K. & Swift, R. (2002). Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *The Science of the Total Environment*, 3(298), 147–161.
- Straube, W., Nestler, C., Hansen, L., Ringleberg, D., Pritchard, P. & Jones, J. (2003). Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnologica*, 2(23), 179-196.
- Sui, H., Li, X., Huang, G. & Jiang, B. (2006). A study on cometabolic bioventing for the in situ remediation of trichloroethylene. *Environmental Geochemistry and Health*, 1(28), 147-152.
- Takahashi, N., Mikami, N., Matsuda, T. & Miyamoto, J. (1985). Hydrolysis of the pyrethroid insecticide cypermethrin in aqueous media. *Journal of Pest Science*, 5(10), 643-648.
- Tallur, P., Megadi, V. & Ninnekar, H. (2008). Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN 1. *Biodegradation*, 1(19), 77–82.

- Tejada, M., Gómez, I. & Del Toro, M. (2011). Use of organic amendments as a bioremediation strategy to reduce the bioavailability of chlorpyrifos insecticide in soils. *Effects on Soil Biology. Ecotoxicol Environ Saf*, 4(2), 1-15.
- Téllez, J. & Valderrama, B. (2000). *Microbiología del petróleo y sus derivados*. México: Instituto de Biotecnología.
- Thengodkar, R. & Sivakami, S. (2010). Degradation of Chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biodegradation*, 21(4), 637-44.
- Thundiyl, J., Judy, S., Nida, B. & Jenny, P. (2008). Intoxicación aguda por plaguicidas: propuesta de instrumento de clasificación. *Bulletin of the World Health Organization*, 4(86), 205–209.
- Tian, L., Ma, P. & Zhong, J. (2003). Impact of the presence of salicylate or glucose on enzyme activity and phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*. *Process Biochemistry*, 38(1), 1125-1132.
- Ting, L., Cheng, S., Na, T., Jun, H., Shao, Y. & Chuan, C. (2007). Effect of copper on the degradation of pesticides cypermethrin and cyhalothrin. *Journal of Environmental Sciences* 19(7) , 235–1238.
- Torres, M., Picó, Y. & Mañes J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 754(6), 301-331.
- Ulla, B., Flemming, E. & Carsten, J. (2002). Method for spiking soil samples with organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1808-1816.

- Van, J., Lloyd, T., Chetry, S., Liou, R. & Peck, J. (2002). *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*.
<https://hwbddocuments.env.nm.gov/Los%20Alamos%20National%20Labs/TA%2011/3654.pdf>
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 5(73), 1163-1172.
- Volke, T. & Velasco, J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: INE-SEMARNAT.
- Volke, T., Velasco, J. & De la Rosa, D. (2005). *Suelos contaminados con metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. México: Instituto Nacional de Ecología.
- Wang, S., Zhang, C., Li, K., Qu, J., Shi, Y. & Yan Y. (2013). Chlorpyrifos-induced stress response in the chlorpyrifos-degrader *Klebsiella* sp. cpk. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1(82), 17-23.
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(12), 237-241
- Wesseling, C., Aragón, A., Rojas, M., López, L., Blanco, L., Soto, A., et al., (2005). Plaguicidas. Efectos del clorpirifos sobre el sistema nervioso de trabajadores bananeros en la Lima, Honduras. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 8(2), 69-91. Recuperado de: <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/1/1/116.pdf>
- Xie, W., Zhou, J., Wang, H. & Chen, X. (2008). Effect of Nitrogen on the Degradation of Cypermethrin and Its Metabolite 3-Phenoxybenzoic Acidification of the pedosphere, 18(5), 638-644.

Anexos

Anexo 1. Análisis general de la identificación de microorganismos con potencial degradador de pesticidas



Anexo 2. Análisis estadístico

Tabla 13. Prueba de normalidad de los datos experimentales (hora 0).

Pruebas de normalidad							
tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Crecimiento	T 1	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 2	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 3	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 5	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 7	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 8	,385	3	.	,750	3	,000
a. Corrección de significación de Lilliefors							
b. Crecimiento es constante cuando tratamiento = T 4. Se ha omitido.							

Tabla 14. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error ^a (hora 0).

Crecimiento			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
3,103	6	14	,038

Tabla 15. Pruebas de los efectos inter-sujetos (ANOVA) (hora 0).

Crecimiento					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	31065,018	6	5177,503	5,772	,003
Dentro de grupos	12558,792	14	897,057		
Total	43623,810	20			

Tabla 16. Pruebas Post Hoc - Subconjuntos homogéneos – Tratamiento (hora 0).

Crecimiento			
HSD Tukey ^a			
tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
T 2	3	208,2500	
T 3	3	215,7500	
T 7	3	215,7500	
T 1	3	233,2500	233,2500
T 5	3	233,2500	233,2500
T 8	3	288,6667	288,6667
T 4	3		316,5000
Sig.		,063	,051

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 17. Prueba de normalidad de los datos experimentales (hora 24).

Pruebas de normalidad^b							
tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Crecimiento	T 1	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 2	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 3	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 4	,385	3	.	,750	3	,000
	T 5	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 7	,175	3	.	1,000	3	1,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. Crecimiento es constante cuando tratamiento = T 8. Se ha omitido.

Tabla 18. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error ^a (hora 24).

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Crecimiento			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,334	6	14	,306

Tabla 19. Pruebas de los efectos inter-sujetos (ANOVA) (hora 24).

Crecimiento					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	172690,625	6	28781,771	52,341	,000
Dentro de grupos	7698,417	14	549,887		
Total	180389,042	20			

Tabla 20. Pruebas Post Hoc - Subconjuntos homogéneos – Tratamiento (hora 24).

HSD Tukey ^a						
tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
T 4	3	49,6667				
T 2	3	91,5000	91,5000			
T 3	3	99,7500	99,7500			
T 5	3		125,0000	125,0000		
T 1	3			175,0000	175,0000	
T 8	3				215,0000	
T 7	3					340,7500
Sig.		,193	,598	,194	,408	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 21. Prueba de normalidad de los datos experimentales (hora 48).

		Pruebas de normalidad^{b,c,d}					
tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Crecimiento	T 1	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 2	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 4	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 7	,175	3	.	1,000	3	1,000
a. Corrección de significación de Lilliefors							
b. Crecimiento es constante cuando tratamiento = T 3. Se ha omitido.							
c. Crecimiento es constante cuando tratamiento = T 5. Se ha omitido.							
d. Crecimiento es constante cuando tratamiento = T 8. Se ha omitido.							

Tabla 22. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error ^a (hora 48).

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Crecimiento			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,679	6	14	,060

Tabla 23. Pruebas de los efectos inter-sujetos (ANOVA) (hora 48).

Crecimiento					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	105935,625	6	17655,938	13,291	,000
Dentro de grupos	18597,250	14	1328,375		
Total	124532,875	20			

Tabla 24. Pruebas Post Hoc - Subconjuntos homogéneos – Tratamiento (hora 48).

Crecimiento					
HSD Tukey ^a					
tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
T 2	3	58,2500			
T 8	3	83,0000	83,0000		
T 3	3	130,0000	130,0000	130,0000	
T 4	3		175,0000	175,0000	175,0000
T 7	3			200,0000	200,0000
T 1	3				233,2500
T 5	3				265,0000
Sig.		,263	,088	,286	,099

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 25. Prueba de normalidad de los datos experimentales (hora 192).

Pruebas de normalidad							
tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Crecimiento	T 1	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 2	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 3	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 4	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 5	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 7	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 8	,175	3	.	1,000	3	1,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla 26. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error ^a (hora 192).

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Crecimiento			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,243	6	14	,100

Tabla 27. Pruebas de los efectos inter-sujetos (ANOVA) (hora 192).

ANOVA					
Crecimiento					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	120514,286	6	20085,714	9,456	,000
Dentro de grupos	29737,500	14	2124,107		
Total	150251,786	20			

Tabla 28. Pruebas Post Hoc - Subconjuntos homogéneos – Tratamiento (hora 192).

Crecimiento				
HSD Tukey ^a				
tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
T 8	3	55,0000		
T 3	3	90,0000	90,0000	
T 4	3	90,0000	90,0000	
T 1	3	157,5000	157,5000	
T 7	3	182,5000	182,5000	182,5000
T 5	3		207,5000	207,5000
T 2	3			290,0000
Sig.		,052	,084	,131

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 29. Prueba de normalidad de los datos experimentales (hora 360).

Pruebas de normalidad							
tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Crecimiento	T 1	,219	3	.	,987	3	,780
	T 2	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 3	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 4	,269	3	.	,949	3	,567
	T 5	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 7	,175	3	.	1,000	3	1,000
	T 8	,319	3	.	,885	3	,339
	a. Corrección de significación de Lilliefors						

Tabla 30. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error ^a (hora 360).

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Crecimiento			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,284	6	14	,326

Tabla 31. Pruebas de los efectos inter-sujetos (ANOVA) (hora 360).

ANOVA					
Crecimiento					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	35182,738	6	5863,790	5,127	,006
Dentro de grupos	16012,500	14	1143,750		
Total	51195,238	20			

Tabla 32. Pruebas Post Hoc - Subconjuntos homogéneos – Tratamiento (hora 360).

Crecimiento				
HSD Tukey ^a				
tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
T 2	3	55,0000		
T 1	3	76,6667	76,6667	
T 5	3	90,0000	90,0000	90,0000
T 4	3	121,6667	121,6667	121,6667
T 8	3	148,3333	148,3333	148,3333
T 3	3		155,0000	155,0000
T 7	3			172,5000
Sig.		,053	,135	,105

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 33. Análisis estadístico general de los tratamientos en etapa de invernadero.

ANOVA	HORA 0		HORA 24					HORA 48				HORA 192			HORA 360		
	<u>F</u>	<u>Sig.</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>	
A	5,772	0,003	52,341					13,291				9,456			5,127		
-	<u>Sub. 1</u>	<u>Sub. 2</u>	<u>Sub. 1</u>	<u>Sub. 2</u>	<u>Sub. 3</u>	<u>Sub. 4</u>	<u>Sub. 5</u>	<u>Sub. 1</u>	<u>Sub. 2</u>	<u>Sub. 3</u>	<u>Sub. 4</u>	<u>Sub. 1</u>	<u>Sub. 2</u>	<u>Sub. 3</u>	<u>Sub. 1</u>	<u>Sub. 2</u>	<u>Sub. 3</u>
T 1	233,25	233,25	-	-	175,0 0	175,0 0	-	-	-	-	233, 25	157, 50	157, 50	-	76,6 7	76,67	-
T 2	208,25	-	91,50	91,50	-	-	-	58,25	-	-	-	-	-	290, 00	55,0 0	-	-
T 3	215,75	-	99,75	99,75	-	-	-	130,0 0	130,0 0	130,0 0	-	90,0 0	90,0 0	-	-	155,0 0	155,0 0
T 4	-	316,50	49,,6 7	-	-	-	-	-	175,0 0	175,0 0	175, 00	90,0 0	90,0 0	-	121, 67	121,6 7	121,6 7
T 5	233,25	233,25	-	125,0 0	125,0 0	-	-	-	-	-	265, 00	-	207, 50	207, 50	90,0 0	90,00	90,00
T 6	215,75	-	-	-	-	-	340,7 5	-	-	200,0 0	200, 00	182, 50	182, 50	182, 50	-	-	172,5 0
T 7	288,67	288,67	-	-	-	215,0 0	-	83,00	83,00	-	-	55,0 0	-	-	148, 33	148,3 3	148,3 3
Sig.	0,63	0,51	0,193	0,598	0,194	0,408	1,00	0,263	0,088	0,286	0,09 9	0,05 2	0,08 4	0,13 1	0,05 3	0,135	0,105

* Subconjuntos para alfa = 0,05

** Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

*** Comparación de medias mediante el Test HSD Tukey ^a