



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

**“ESTABLECIMIENTO DE UN POTENCIAL PROTOCOLO DE
ACTUACIÓN PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE PESTICIDAS
ORGANOFOSFORADOS EN LAS AGUAS RESIDUALES DE LOS
CENTROS DE ACOPIO DEL ECUADOR”**

Trabajo de titulación previo la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: UQUILLAS ROMO EDGAR ALEXIS
TUTOR: ING. ANDRÉS BELTRAN

Riobamba-Ecuador

2015

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

El Tribunal del trabajo Titulación certifica que: El trabajo de titulación: “ESTABLECIMIENTO DE UN POTENCIAL PROTOCOLO DE ACTUACIÓN PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN LAS AGUAS RESIDUALES DE LOS CENTROS DE ACOPIO DEL ECUADOR”, de responsabilidad del señor egresado Edgar Alexis Uquillas Romo, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Andrés Beltrán

DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN

Ph.D. Sergio Barón

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Edgar Alexis Uquillas Romo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

EDGAR ALEXIS UQUILLAS ROMO

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

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

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

Riobamba, 3 de Diciembre del 2015

Edgar Alexis Uquillas Romo
0604235010

DEDICATORIA

A mis padres que me apoyaron en todo momento durante mi vida estudiantil y cotidiana, siendo ellos el pilar del cual supe sostenerme para seguir adelante en los momentos difíciles así como a mi familia y amigos por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

EDGAR UQUILLAS

AGRADECIMIENTO

Mi eterno agradecimiento a todas las personas que me ayudaron con este trabajo para obtener mi título como Ingeniero en Biotecnología Ambiental, en especial a mis padres Edgar y Mónica, por sus valiosos consejos, anécdotas, comprensión y su guía durante todo mi proceso de formación académica.

A Dios por darme la fortaleza para jamás rendirme y ser una constante motivación en mi vida.

A mis tutores Ing. Andrés Beltrán y Dr. Sergio Barón por guiarme durante todo este arduo trabajo, colaborando desinteresadamente y aportando su vasto conocimiento a la investigación, a la Ing. Ana Cunachi, Ing. Normita Erazo e Ing. Ruperto Mancheno por brindarme todas las facilidades en el uso del laboratorio de recursos naturales, así como su acertada colaboración durante la ejecución de la misma.

A mis familiares y amigos que de una u otra manera estuvieron en los momentos más difíciles en este período de mi vida así como también en los buenos momentos.

Edgar

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv

INTRODUCCION

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Antecedentes de la investigación.....	5
1.2 Bases teóricas.....	6
1.2.1 Biorremediación.....	6
1.2.2 Pesticidas.....	9
1.2.3 Aguas Residuales.....	13
1.2.4 Lodos Activos.....	14
1.2.5 Organismos Vivos.....	15
1.2.6 Microorganismos.....	19

CAPITULO II

MARCO METODOLOGICO

2.1 Materiales y Métodos.....	30
2.1.1 Tipo y Diseño de la investigación.....	30
2.1.2 Unidad de Análisis.....	30
2.1.3 Población de Estudio.....	30
2.1.4 Tamaño de Muestra.....	30
2.1.5 Selección de Muestra.....	30
2.1.6 Análisis e Interpretación de la Información.....	33
2.2 Obtención de microorganismos a partir de muestras de lodos.....	34
2.2.1 Sitio de muestreo para la obtención de microorganismos.....	34
2.2.2 Procedimiento.....	35
2.3 Análisis de laboratorio.....	36
2.4 Obtención y aislamiento de microorganismos en el laboratorio.....	36
2.4.1 Preparación de medios de cultivo.....	36
2.4.2 Siembra y conteo de microorganismos.....	38
2.4.3 Aislamiento de microorganismos.....	39

2.4.4	<i>Conservación de microorganismos</i>	39
2.5	Caracterización primaria de los microorganismos aislados	40
2.5.1	<i>Caracterización morfológica</i>	40
2.5.2	<i>Tinción de Gram</i>	41
2.5.3	<i>Prueba de la catalasa</i>	42
2.5.4	<i>Prueba de la oxidasa</i>	42
2.6	Identificación bioquímica de microorganismos aislados kit Microgen GN-ID	42
2.6.1	<i>Procedimiento-inoculación e incubaciones</i>	42
2.6.2	<i>Procedimiento-lectura y adicción de reactivos</i>	43
2.7	Bioensayos con pesticidas organofosforados	44
2.7.1	<i>Selección de pesticidas que se aplicaran en los bioensayos</i>	44
2.7.2	<i>Preparación de medios de cultivo a diferentes concentraciones de pesticidas</i>	45
2.7.3	<i>Bioensayos aplicados a los microorganismos aislados</i>	45
2.7.4	<i>Prueba de interacción microbiana</i>	45

CAPITULO III

MARCO DE ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1	Conteo de microorganismos en UFC	47
3.2	Análisis de laboratorio	48
3.2.1	<i>Análisis físico químico del efluente de aguas residuales</i>	48
3.2.2	<i>Análisis físico químico del afluente liberado al medio</i>	48
3.2.3	<i>Análisis físico químico de los lodos activos</i>	49
3.3	Caracterización primaria de los microorganismos aislados	50
3.3.1	<i>Caracterización morfológica</i>	50
3.3.2	<i>Tinción de Gram</i>	53
3.3.3	<i>Prueba de la oxidasa</i>	54
3.3.4	<i>Prueba de la catalasa</i>	55
3.4	Bioensayos con pesticidas organofosforados	56
3.4.1	<i>Selección de pesticidas que se aplicaron en los bioensayos</i>	56
3.4.2	<i>Bioensayos aplicados a los microorganismos aislados</i>	57
3.4.3	<i>Análisis estadístico y prueba de hipótesis</i>	62
3.4.4	<i>Prueba de interacción microbiana</i>	63
3.5	Identificación bioquímica de microorganismos aislados kit Microgen GN-ID	66
3.6	Establecimiento del potencial protocolo de actuación	67

CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	72

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL50(mg/kg).....	10
Tabla 2-1	Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad.....	10
Tabla 3-1	Clasificación de los plaguicidas, según la familia química.....	10
Tabla 4-1	Tipos básicos de células, resumen básico.....	14
Tabla 5-1	Tipos de microorganismos según su fuente de energía y carbono.....	20
Tabla 6-1	Algunas enzimas y microorganismos reportados en degradación de Plaguicidas.....	22
Tabla 7-1	Medios de cultivo.....	25
Tabla 1-2	Coordenadas geográficas del centro de acopio Guaslán.....	31
Tabla 2-2	Coordenadas geográficas del sitio de muestreo de lodos.....	34
Tabla 3-2	Profundidades determinadas en cada punto de muestreo pre-seleccionado.....	35
Tabla 4-2	Reactivos para la preparación de medios de cultivos.....	37
Tabla 5-2	Pesticidas suministrados por el M.A.G.A.P.....	44
Tabla 1-3	Conteo de microorganismos en UFC del aislamiento primario.....	47
Tabla 2-3	Análisis físico químico del efluente de aguas residuales del centro de acopio-Guaslán.....	48
Tabla 3-3	Análisis físico químico del afluente liberado al medio por parte del centro de acopio-Guaslán.....	49
Tabla 4-3	Análisis físico químico de los lodos activos en el centro de acopio-Guaslán.....	49
Tabla 5-3	Caracterización morfológica de los microorganismos aislados.....	50
Tabla 6-3	Tinción de Gram en los microorganismos aislados.....	54

Tabla 7-3	Prueba de la oxidasa en los microorganismos aislados.....	55
Tabla 8-3	Prueba de la catalasa en los microorganismos aislados.....	55
Tabla 9-3	Microorganismos que presentaron mejor crecimiento en los bioensayos.....	57
Tabla 10-3	Anova de un factor crecimiento bacteriano hipótesis 1.....	63
Tabla 11-3	Anova de un factor crecimiento bacteriano hipótesis 2.....	63
Tabla 12-3	Microorganismos sometidos a la prueba de interacción microbiana.....	64
Tabla 13-3	Identificación bioquímica de los microorganismos aislados.....	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Parámetros implicados en la biorremediación.....	7
Figura 2-1	Actividades microbianas en el proceso de biorremediación.....	8
Figura 3-1	Clasificación según su peligrosidad y toxicidad.....	11
Figura 4-1	Formas y agrupaciones de las bacterias.....	17
Figura 5-1	Método de siembra por estría en placa para el aislamiento de cultivos bacterianos puros.....	26
Figura 6-1	Tinción de Gram.....	28
Figura 1-2	Fotografía de la ubicación del centro de acopio Guaslán.....	32
Figura 2-2	Fotografía de la ubicación del sitio de muestreo de lodos señalada en verde dentro del centro de acopio-Guaslán.....	34
Figura 3-2	Plano de descarga de aguas del centro de acopio-Guaslán.....	34
Figura 4-2	Puntos de muestreo para la obtención de microorganismos en la fosa séptica ubicada dentro del centro acopio-Guaslán.....	36
Figura 5-2	Recuentos en placa y diluciones seriadas.....	37
Figura 6-2	Tabla de color, kit microgen GN – ID.....	44
Figura 1-3	Número de microorganismos vs Color de los microorganismos aislados.....	52
Figura 2-3	Número de microorganismos vs Elevación de los microorganismos aislados.....	52
Figura 3-3	Número de microorganismos vs Forma de los microorganismos aislados.....	53
Figura 4-3	Número de microorganismos vs Margen de los microorganismos aislados.....	53
Figura 5-3	Selección de pesticidas usados para esta investigación.....	56
Figura 6-3	Diagrama funcional del posible protocolo de actuación.....	70
Figura 7-3	Esquema de construcción de las fosas sépticas.....	70
Figura 8-3	Esquema corte transversal y dimensiones fosa séptica.....	70

INDICE DE ANEXOS

Anexo A Sitio de Muestro

Anexo B Crecimiento inicial de los microorganismos aislados de los lodos activos

Anexo C Bacterias Aisladas

Anexo D Conservación de los microorganismos aislados

Anexo E Tinción de Gram

Anexo F Prueba de la Catalasa

Anexo G Prueba de la Oxidasa

Anexo H Bioensayos

Anexo I Interacciones microbianas

Anexo J Identificación bioquímica con el kit Microgen GN-ID

Anexo K Análisis de laboratorio

RESUMEN

Las altas concentraciones de organofosforados en verduras, hortalizas y frutas en los centros de acopio provocan contaminación al recurso agua; siendo necesario establecer un potencial protocolo de actuación para la biorremediación de pesticidas organofosforados en las aguas residuales de los centros de acopio del Ecuador. Para esto se analizaron las propiedades físico-químicas del: efluente de aguas residuales, afluente que es liberado al medio y lodo ubicado en la fosa séptica del centro de acopio de la comunidad Ecuatoriana de Guaslán. Se extrajeron muestras de lodo para la obtención y aislamiento de microorganismos con potencial uso en biorremediación. Para el aislamiento de estos microorganismos se usó una cámara de flujo laminar, autoclave, estufa e incubadora así como Agar nutritivo y Agar Gym. Para su conservación se usó la técnica de tubo inclinado con glicerol. Las pruebas usadas para la caracterización primaria de los microorganismos aislados fueron: tinción de Gram, prueba de catalasa, prueba de oxidasa y caracterización morfológica. Se realizaron bioensayos a concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 2 ($\mu\text{g.l}^{-1}$) seleccionados a partir de su toxicidad. Los microorganismos seleccionados por su actividad de biorremediación tras realizar los bioensayos fueron sometidos a pruebas de interacción microbiana. Para la identificación bioquímica de los microorganismos aislados se utilizó el kit Microgen GN-ID. En total se obtuvieron 12 especies bacterianas con actividad degradadora de los organofosforados y que no presentaban interacciones entre ellas. Concluimos que tras establecer los criterios técnicos, es factible la implementación de un potencial protocolo de actuación para la biorremediación de pesticidas organofosforados en las aguas residuales de cualquier centro de acopio del Ecuador. Se recomienda la construcción de una planta piloto, para realizar pruebas en campo de los criterios técnicos descritos en el protocolo para lodos e inóculo.

Palabras Clave:

<BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES><PROTOCOLO><PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS><BIOENSAYOS><INTERACCIONES MICROBIANAS><CARACTERIZACIÓN MICROBIANA><IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS><CENTROS DE ACOPIO DEL ECUADOR>

SUMMARY

High levels of organophosphates in vegetables and fruit in the storage centers cause pollution to water resources; it is necessary to establish a potential protocol of action for bioremediation of organophosphate pesticides in waste water of storage centers in Ecuador. For this purpose, the waste water effluent which is released into the environment and mud from the septic tanks located in Guaslán-Ecuador, were analyzed. Mud samples were extracted to obtain and isolate microorganisms with a potential use of bioremediation. For these microorganism isolation a laminar flow camera, autoclave, oven and incubator as well as nutrient Agar and Gym Agar were used. For preservation the slanted glycerol tube technique was used. The tests used for primary characterization of the isolated microorganism were gram strain, catalase test, oxidase test and morphological characterization. Bioassays were performed at concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 2 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) selected from toxicity. The microorganism selected for bioremediation activity after performing bioassays were tested for microbial action. The Microgen GN-ID kit was used for the biochemical identification of isolated microorganisms. A total of 12 bacterial species with degrading organophosphate activity were obtained and there is not interaction among them. It is concluded that after establishing some technical criteria, the implementation of a potential protocol of action for bioremediation of organophosphate pesticides in waste water of any storage center in Ecuador is feasible. It is recommended to build a pilot plant, for testing out in the field of technical criteria described in the protocol for mud and inoculum.

Keywords:

<PROTOCOL OF ACTION><WASTEWATER BIOREMEDIATION><ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES><BIOASSAYS><MICROBIAL INTERACTIONS><MICROBIAL CHARACTERIZATION><MICROORGANISMS BIOCHEMICAL IDENTIFICATION><STORAGE CENTERS OF ECUADOR>

INTRODUCCIÓN

Situación Problemática.

Actualmente, el único centro de acopio perteneciente al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (M.A.G.A.P) en el Ecuador, se encuentra ubicado en la vía principal que comunica a la ciudad de Riobamba con Macas, a 6Km de Punín, en la Parroquia Rural San Luis del Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo. Este centro es el encargado de receptor frutas, hortalizas, y verduras de todas las regiones del país, y es el lugar donde se llevó a cabo la toma de muestras para la fase experimental de esta investigación.

Según datos proporcionados por el M.A.G.A.P, existen 44 productos que maneja el centro de acopio y estos son: papa, remolacha, cebolla colorada, zanahoria, naranja, mandarina, yuca, pepinillo, limón, perejil + apio, cilantro, cebolla blanca, col blanca, col morada, lechuga, brócoli, coliflor, arveja, habas, fréjol, choclo, vainita, acelga, nabo, espinaca, rábano, melloco, verde, madura, mora, frutilla, papaya, sandía, granadilla, manzana, pera, Claudia, zambo, zapallo, chocho, hierba dulce, tomate riñón y tomate de árbol.

El M.A.G.A.P proporciona diferentes insumos a los agricultores de la zona 3 del Ecuador conformado por las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cotopaxi, Pastaza y Tungurahua. Estos insumos están comprendidos en 4 kits: el primer kit corresponde a cultivos de ciclo corto, el kit 2 corresponde a cultivos de ciclo permanentes, el kit 3 corresponde a semilleros y el kit 4 corresponde a registro social.

Entre estos 4 kits, el M.A.G.A.P proporciona a los agricultores 10 pesticidas para el uso en sus sembradíos y estos son: Pyrinox Plus, Decis, Acefato, Amitraz, Imidacloprid, Tracer, Profenofos, Cipermetrina, Fipronil y Metomil. Entre los componentes más destacados están los pesticidas organofosforados que, junto a los carbamatos y bipiridilos, son los insecticidas más utilizados en cultivos para el control de plagas y los más frecuentes involucrados en intoxicaciones en todo el mundo (Cárdenas, et al., 2005, p.171).

En el centro de acopio de la comunidad Guaslán, las frutas y hortalizas provenientes de todas las regiones del Ecuador son lavadas y empacadas con la finalidad de darles un valor agregado. Las aguas resultantes de este lavado presentan una alta concentración de organofosforados a través de la acumulación de los distintos pesticidas usados por los agricultores en sus sembríos.

Sin embargo, parece ser que las aguas liberadas por este centro de acopio están dentro de los límites de organofosforados permitidos por la legislación vigente, esto podría ser debido a que en dicho lugar se está produciendo una biorremediación natural antes de su liberación al medio ambiente y esta no ha sido advertida o voluntaria.

Formulación del Problema

Los productos agrícolas que llegan a los centros de acopio de todo el país, por norma general presentan una alta carga de pesticidas. Debido a este hecho, cabe esperar que las aguas residuales producidas en los procesos de lavado de estos productos agrícolas presenten una alta concentración de organofosforados.

Justificación

En los últimos años el público en general ha mostrado un aumento en el interés por el consumo de alimentos orgánicos, en los que no haya la presencia de potentes químicos que pongan en riesgo su salud. Observando esta situación, el M.A.G.A.P ha introducido el uso de bioabonos para eliminar o minimizar la utilización de fertilizantes químicos en los sembradíos de la provincia de Chimborazo.

A pesar de los esfuerzos del M.A.G.A.P, no se pueden controlar todos los productos que ingresan al centro de acopio, ya que estos provienen de la Costa, Sierra y Amazonía Ecuatoriana. Se ha evidenciado que en la misma comunidad de Guaslán los agricultores continúan utilizando compuestos químicos con diversas funciones, entre los que destacan pesticidas, fertilizantes, herbicidas y fungicidas entre otros.

Baird (2001, pp. 6-12) nos indica que los fertilizantes químicos, por ejemplo mediante procesos de filtración, son algunos de los principales causantes de la contaminación de los mantos freáticos. Además nos sugiere que los ríos también pueden ser contaminados por estos compuestos mediante su arrastre por el agua de lluvia o por otros factores medioambientales.

Existen muchas evidencias científicas que sugieren que los compuestos organofosforados pueden afectar al organismo humano, debido a su alta toxicidad y a su alta absorción por vías respiratorias, o por el riesgo de ingestión (Plenge, et al., 2007, p.5).

El efecto más conocido que producen los pesticidas organofosforados está ligado a la inhibición de la proteína acetilcolinesterasa. Estos plaguicidas son capaces de fosforilar a esta esterasa del

sistema nervioso convirtiéndola en una esterasa neurotóxica que es responsable de la neuropatía retardada (Ramírez, et al., 2004, p.249).

Ramírez y Lacasaña (2001, pp.67-75) nos indican que la vía dérmica es la más importante en el ámbito laboral, pues a través de ella se absorben cantidades significativas de diversos plaguicidas, mientras que en la población general las vías de absorción más importantes son el aparato digestivo y las vías aéreas.

La absorción en el aparato digestivo se produce a partir de la ingestión de alimentos y agua contaminada, mientras que la absorción por las vías aéreas es por la frecuente fumigación de plaguicidas en las zonas de cultivo y por su arrastre a través del viento hacia zonas aledañas. Esto favorece la presencia del producto en el ambiente en forma continua y en pequeñas cantidades.

Para lograr controlar o eliminar los compuestos organofosforados, es necesario reducir el uso en el campo, y aplicar procesos de depuración de las aguas residuales de las plantas de tratamiento de productos agrícolas, de manera que estos compuestos nocivos no sean liberados al medio. De esta manera podremos reducir la posibilidad de que se acumulen en el ambiente, y entren contacto con la población, con las importantes implicaciones en salud pública que ello conlleva.

Debido a que actualmente no es bien conocida la situación real del centro de acopio de Guaslán, es necesario determinar si este centro de acopio está liberando niveles indebidos de organofosforados y, en el caso de que sea así, usarlo como modelo para determinar procesos de biorremediación capaces de subsanarlos. Como la eliminación de organofosforados debe estar producida por microorganismos, es importante determinar en qué nivel del proceso se podrían realizar estos procesos de biorremediación y determinar que organismos la podrían producir.

Por lo tanto, este estudio beneficiará a las empresas o instituciones relacionadas con el sector agrícola, que presenten liberación al medio de concentraciones ilegales de organofosforados, ya que una vez estandarizado el modo de actuar, el proceso se podría trasladar a diversos centros de acopio.

Objetivos

Objetivo general

Establecer un potencial protocolo de actuación para la biorremediación de pesticidas organofosforados en las aguas residuales de los centros de acopio del Ecuador.

Objetivos específicos

- Caracterizar el efluente de aguas residuales del centro de acopio-Guaslán antes de que sea depositado en la fosa séptica, el afluente que es liberado al medio y los lodos activos donde las aguas son almacenadas antes de su descarga.
- Determinar los microorganismos presentes en los lodos activos de la fosa séptica que sean capaces de degradar los compuestos organofosforados
- Evaluar la actividad degradadora de organofosforados del consorcio microbiano aislado y seleccionado con fines biorremediadores
- Explicar los criterios técnicos y metodológicos para el establecimiento del potencial protocolo de actuación en la biorremediación de pesticidas organofosforados

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

A nivel mundial está demostrado que para la selección de los inóculos que puedan ser usados en biorremediación de entornos contaminados con pesticidas, es importante tener en cuenta que no todos los microorganismos son capaces de adaptarse al nuevo medio en el que quieren ser introducidos.

Zaidi y Mehta (1995, p.275-281), utilizaron 4 cepas distintas para biorremediar aguas industriales contaminadas con Nitrofenol (PNP). Observaron que la cepa Z4 de *Corynebacterium* era capaz de eliminar PNP en lagos y aguas residuales con gran eficiencia (90% del PNP cuando se encontraba a concentraciones de 20 mg/ml).

También comprobaron que añadiendo al agua glucosa (100 mg/ml) como segundo sustrato no mejoraba el proceso, al igual que pasaba con la cepa MS de *Pseudomonas*. Por el contrario, el aumento de glucosa si producía una mejora en los procesos de degradación del PNP en las cepas GR de *Pseudomonas*. Los resultados presentados por estos autores sugieren que la presencia de un segundo sustrato orgánico puede mejorar la velocidad y el grado de biodegradación de compuestos orgánicos.

En Latinoamérica en la ciudad de Morelos, México, se aislaron dos consorcios bacterianos con la capacidad de crecer en un habiente con presencia de pesticidas organofosforados. Se usaron como fuente de carbono paratión metílico y cadusafos, y como fuente alternativa glucosa. El consorcio que presentó mayor capacidad de crecimiento fue el que creció en paratión metílico a una concentración de 10 mg L⁻¹, mientras que el consorcio en presencia de cadusafos presentó mejores resultados a 100 mg L⁻¹.

Sin embargo ambos consorcios microbianos presentaron valores más altos de crecimiento en un proceso de cometabolismo en presencia de glucosa, revelando mediante estos resultados el potencial de los consorcios bacterianos para el tratamiento de plaguicidas organofosforados (Castrejón, et al., 2005, pp.1-5).

En Ecuador se realizó el aislamiento e identificación de varios hongos y bacterias a partir del efluente de una extractora de aceite rojo de Palma Africana. Con este aislamiento se pretendió obtener información acerca de los tipos de microorganismos existentes en el agua residual que pudieran ser usados como agentes biorremediadores (Rodríguez, 2008, pp 14-15).

También se realizó el aislamiento, identificación y elaboración de un consorcio microbiano con la finalidad de biorremediar aguas y sedimentos contaminados provenientes del agua residual de las muestras procesadas en el LAB-CESSTA de la ESPOCH. (Miranda, 2014, p.1).

1.2. Bases Teóricas

1.2.1. Biorremediación.

La biorremediación en suelos y en agua ha tomado una especial relevancia en los últimos años. Esto se debe a que los costos son bajos y es ambientalmente amigable comparándolo con los procedimientos físicos y químicos ampliamente utilizados en años anteriores para la descontaminación de lugares afectados por vertidos de crudo, la presencia de metales en los cauces de río por la minería, tratamiento de aguas residuales industriales, etc.

La biorremediación también presenta una serie de desventajas como son el largo tiempo que le toma a la microbiota degradar a los compuestos contaminantes, en función de la cantidad de contaminante y de las condiciones ambientales favorables para la proliferación y actividad de los microorganismos. (Ferrera, et al., 2006, pp.179-187).

Por lo tanto, podemos definir biorremediación como el uso de microorganismos, hongos, enzimas y algunos tipos de algas para obtener la mineralización de agentes contaminantes y transformarlos en compuestos más simples y de menor peligrosidad.

Estos agentes contaminantes pueden ser físicos, químicos o biológicos, y generan un efecto adverso en el recurso agua y suelo. Los microorganismos autóctonos (aquellos que son encontrados en el sitio contaminado) son los mejores para biorremediar tanto el recurso agua como el recurso suelo por su adaptación natural al agente contaminante (Corredor, et al., 2013, pp.119-135).

Es necesario tomar en cuenta un grupo general de contaminantes que son los xenobióticos, estos han sido creados por el hombre con fines industriales o agrícolas y no se encuentran de forma

natural en nuestro planeta. Muchos de estos compuestos representan un gran problema para la salud de los ecosistemas pero también existen aquellos que son susceptibles a una biorremediación.

Los pesticidas, por ejemplo pueden actuar como fuente carbono para los microorganismos. Otro aspecto relevante de los pesticidas radica en su persistencia en el ambiente dependiendo de muchos factores como son el pH, la temperatura ambiental, porcentaje de materia orgánica y estructura química. En el caso de los organoclorados, esta estructura les confiere una alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en el agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos (Ramírez y Lacasaña, 2001, pp.67-75). Desgraciadamente muchos de estos pesticidas son bastante tóxicos para los seres humanos y otros mamíferos. (Baird, 2001, pp. 6-12)

1.2.1.1. Clasificación de la biorremediación.

La aplicabilidad de la biorremediación es muy amplia, tomando como objeto de estudio los estados la materia obtenemos la siguiente clasificación:

- Sólido: El recurso suelo, lodos, etc
- Líquido: Aguas residuales, Aguas superficiales y subterráneas
- Gaseoso: Emisiones producidas por la industria

También se puede sugerir otra clasificación pero en función de los contaminantes:

- Hidrocarburos de cualquier tipo
- Hidrocarburos clorados
- Metales pesados
- Otros contaminantes



Figura 2-1. Parámetros implicados en la biorremediación.

Fuente: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358006/contLinea/leccin_44_biorremediacion.html

1.2.1.2. Tipos de biorremediación.

La biorremediación por aplicabilidad puede ser de 3 tipos:

- Bioestimulación o fertilización es una método de biorremediación de adicción de nutriente Ej: N, P, K en el sitio contaminado para estimula el crecimiento de los microorganismos.
- Bioaumentación o inoculación consiste en la adicción de microorganismo al sitio contaminado.
- Uso de microorganismo modificados genéticamente.

1.2.1.3. Biorremediación de pesticidas.

En la actualidad existe una lucha latinoamericana para le degradación de pesticidas. En el Ecuador muchos de los productos que contienen organoclorados han sido prohibidos, pero eso no ha eliminado del ambiente las altas concentraciones de estos compuestos. Los pesticidas organofosforados aún son utilizados pese a que muchos de estos presentan propiedades tóxicas y contraproducentes para el medio ambiente. Por ello es necesario que en Latinoamérica se den estudios de biodegradación de compuestos organoclorados y organofosforados mediante el uso de la gran biodiversidad de microorganismos presentes en nuestros suelos.

Los microorganismos evolucionan hasta el punto de usar como sustrato a los compuestos organofosforados, siendo utilizados como fuente de carbono de los mismos. Se han identificado algunos microorganismos que pueden ser usados para la biorremediación de suelos contaminados con pesticidas. Entre los más comunes tenemos a las *Pseudomonas* como las bacterias más eficientes en la degradación de pesticidas (Torres, 2003, p.2). Para que la biorremediación sea exitosa depende de varios factores entre los que podemos citar: condiciones ambientales en las cuales se desarrollan los microorganismos implicados en la biorremediación y su versatilidad fisiológica. (Cabello, 2010, pp. 7-11)

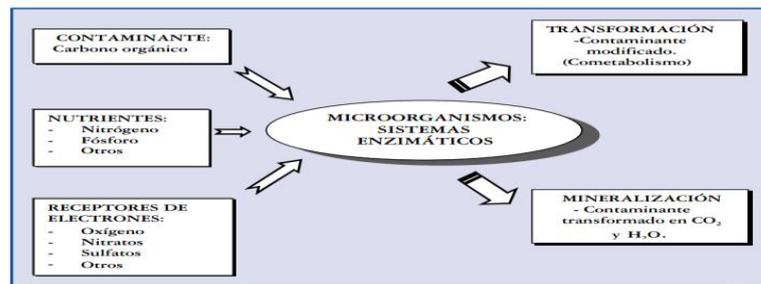


Figura 2-1. Actividades microbianas en el proceso de biorremediación.
Fuente: (Sánchez y Rodríguez, 2003).

1.2.1.4. Factores de los cuales depende la aplicabilidad de la biorremediación.

Los factores de los cuales depende la aplicabilidad de la biorremediación fueron descritos Sánchez y Rodríguez (2013, pp.12-16) y son los siguientes:

- Propiedades del contaminante.
- Presencia de comunidades microbianas adecuadas, con capacidad enzimática para metabolizar el compuesto.
- Disponibilidad del contaminante.
- Condiciones del medio contaminado: Propiedades que permiten o limitan el crecimiento microbiano y el metabolismo del compuesto.

1.2.2. Pesticidas

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la Food and Agriculture Organization (FAO, p.28) de las Naciones Unidas establece que un plaguicida es “la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir, o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal”. Son compuestos químicos de origen orgánico o inorgánico conocidos como xenobióticos ya que fueron inventados por el hombre e introducidos al medio ambiente.

Los pesticidas han generado preocupación casi desde su aparición. En los Estados Unidos, en los años 40-50, se produjo una gran cantidad de insecticidas en cuya composición abundaban los compuestos organoclorados. Debido a su potencial impacto sobre la salud humana, estos compuestos fueron sustituidos paulatinamente por los compuestos organofosforados. El término pesticida abarca a los plaguicidas, herbicidas, fungicidas, etc. y demás compuestos químicos que el ser humano ha creado para combatir males que aquejaban a sus cultivos.

La aparición de los pesticidas tenía una finalidad netamente agrícola así como para control de plagas. Sin embargo, los pesticidas orgánicos e inorgánicos son, por norma general, bastante tóxicos para los seres humanos y otros mamíferos cuando son administrados en dosis necesarias para actuar como pesticidas. (Baird, 2001, pp.6-12).

En los últimos años varios países latinoamericanos han prohibido las importaciones de pesticidas derivados de los organoclorados como es el caso del DDT. A pesar de los esfuerzos de los gobiernos latinoamericanos, siguen llegando a estos países pesticidas en cuya fórmula podemos encontrar compuestos organoclorados.

En el Ecuador estos productos son vendidos a los agricultores sin ningún tipo de control o criterio técnico, propiciando el uso indiscriminado de pesticidas en el país. Por el contrario, los pesticidas organofosforados que son de libre venta, siendo accesible para cualquier persona, lo que conlleva a un abuso en la utilización de este tipo de pesticidas por desconocimiento de los efectos que estos producen en la salud humana.

Una investigación previa de Viteri (2015, p.1) indica que el desconocimiento de los efectos nocivos de los pesticidas organofosforados se debe a que la sintomatología clínica es inespecífica y pasa fácilmente desapercibida en los agricultores.

1.2.2.1. Clasificación de los plaguicidas.

Tabla 1-1: Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL50(mg/kg).

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

Fuente: (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Tabla 2-1: Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad.

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanente	Indefinidamente	Producto echo a partir de mercurio, plomo, arsénico

Fuente: (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Tabla 3-1: Clasificación de los plaguicidas, según la familia química.

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín

Tabla 3-1: Continuación

Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malati6n
Carbamatos	Carbaryl, methomyl
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato
Derivados bupiridilos	Cloromequat, paraquat
Derivados del 6cido fenoxiac6tico	Diclorprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofen6licos	DNOC, dinoterb
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn
Compuestos org6nicos del esta6o	Cyhexatin, dowco
Compuestos inorg6nicos	Ars6nico pent6xido, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, antimonio, mercurio, selenio, talio
Compuestos de origen bot6nico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

Fuente: (Ram6rez y Lacasa6a, 2001)

Categoría	Pictograma	Frase de advertencia	color	DL ₅₀ Aguda*			
				VIA ORAL		VIA DERMICA	
				sólido	líquido	sólido	líquido
Ia Extremadamente peligroso		Muy t6xico		5 ó menos	20 ó menos	10 ó menos	40 ó menos
Id Altamente Peligroso		T6xico		5-50	20-200	10- 100	40-400
II Moderadamente Peligroso		Nocivo		50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III Ligeramente Peligroso		Cuidado		más de 500	más de 2000	mas de 1000	mas de 4000
IV/5 no representan peligrosidad		Precauci6n		más de 2000	mas de 3000		

Figura 3-1. Clasificaci6n seg6n su peligrosidad y toxicidad.

Fuente: (Valencia, et al, 2014, p. 33)

1.2.2.2. Compuestos organofosforados.

El ser humano est6 constantemente expuesto a concentraciones desconocidas de pesticidas en su d6a a d6a, especialmente en Latinoam6rica ya que sus pa6ses subsisten de la agronom6a. El cuerpo

humano puede resistir ciertos niveles de estos contaminantes, pero especialmente los pesticidas organofosforados pueden producir efectos crónicos ya que ejercen una acción sistémica sobre las especies expuestas. Son altamente tóxicos y se absorben rápidamente mediante la ingestión y por la piel, viéndose afectado por este tipo de compuestos los insectos, mamíferos y el ser humano, siendo la población infantil la más afectada.

Estudios demuestran que incluso a bajas dosis de plaguicidas organofosforados se evidencian efectos adversos en el desarrollo del sistema nervioso y el cerebro de niños en crecimiento (Murcia y Stashenko, 2008, p.71; Plenge, 2007, p.5).

Actualmente en el Ecuador y en gran parte de Latinoamérica los pesticidas organofosforados han reemplazado en gran medida a los compuestos organoclorados. Los compuestos organofosforados generalmente son más tóxicos en términos de toxicidad aguda, pero se degradan más rápido en el ambiente. Esta condición de los compuestos organofosforados ha llevado a asumir que estos tienen menor presencia en los sistemas acuáticos. Sin embargo, se ha demostrado que, por ejemplo, el pesticida fenitrotion es capaz de acumularse en plantas acuáticas mostrando la capacidad que tienen las algas de concentrar insecticidas desde el medio. (Asselborn, et al., 2000, p.281).

1.2.2.3. Compuestos Químicos emergentes.

Los contaminantes emergentes, recientemente identificados por los avances de la tecnología, han pasado en gran medida inadvertidos y aún no han sido regulados por las entidades de control. En la actualidad muchos de estos contaminantes están en proceso de regulación por los posibles efectos adversos en la salud de animales y humanos.

Como ejemplo de compuestos químicos emergentes podemos mencionar a “los residuos farmacéuticos, aditivos de gasolinas, productos para el cuidado personal, esteroides, antisépticos, retardantes de fuego, aditivos de las gasolinas, pesticidas, hormonas y subproductos de la desinfección del agua” (Bravo, 2009, p.1). Estos compuestos se encuentran diseminados en el ambiente y se han detectado en fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso en agua potable (Gil, et al, 2012, pp.52-73).

Dentro de los contaminantes emergentes estarían los metabolitos producto de la degradación de pesticidas. Estos metabolitos han sido ignorados hasta la fecha y se considera que pueden ser más tóxicos que los compuestos de los que proceden. (Gil, et al, 2012, pp.52-73) Debido a que los pesticidas han sido estudiados durante décadas, se tiene un conocimiento aceptable de ellos y su presencia en el medio acuático, siendo los pesticidas son causantes de grandes problemas en la naturaleza.

Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos ecotoxicológicos no están disponibles, así que es difícil predecir qué efectos de salud pueden tener en seres humanos y organismos acuáticos (Barceló, 2003 citado en Bravo, 2009). Esto los vuelve contaminantes de interés y necesitan ser más estudiados para proponer nuevos métodos de degradación. (García, Gortáres, y Drogui, 2011, pp.96-105; Bravo, 2009; Gil, et al, 2012, pp.52-73).

1.2.2.4. Degradación e inactivación de plaguicidas.

Las propiedades físico-químicas de los pesticidas son las que determinan en qué modo influyen, su movilidad en el medio ambiente, y con qué grado de eficacia es posible eliminarlos según los diversos métodos existentes (Bouaid, 2006, pp. 8-17). En varios países del mundo se ha identificado que los pesticidas no permanecen en un mismo sitio, sino que son transportados por las corrientes de agua o por el viento, o se produce su ingesta accidental a través de los alimentos (Ej: organoclorados y organofosforados).

De ahí surgen nuevas ideas para la eliminación de estos contaminantes como es el tratamiento biológico mediante el uso de microorganismos autóctonos, mediante bioestimulación o bioaumentación, o introduciendo al sitio contaminado cepas modificadas genéticamente. Estas técnicas son una alternativa para solucionar los problemas que producen la contaminación de aguas y suelos, especialmente por la presencia de fertilizantes, herbicidas y plaguicidas. (Sánchez y Rodríguez, 2003, pp.12-16)

Otra problemática que surge es el manejo de los envases de los pesticidas. A pesar de que en el Ecuador existen campañas publicitarias que indican al agricultor que debe realizar un triple lavado esto es raramente aplicado en los sectores rurales.

Generalmente, estos envases van directamente a los cuerpos de agua dulce, son incinerados con los desechos o enterrados en hueco y tapado con tierra, muy lejos de ser una disposición final adecuado para este tipo de productos. Es por esto que la disposición final de estos envases es importante para la disminución de los efectos directos e indirectos del uso de estos productos. Sólo una actuación segura y amigable con el ambiente puede permitir una reducción de los efectos colaterales. (Valencia, et al, 2014, pp. 49-50)

1.2.3. Aguas Residuales.

La población de Latinoamérica está expuesta a compuestos tóxicos a través de las aguas residuales provenientes de la agricultura así como al uso de sedimentos para mejorar los suelos en los que

se acumulan una gran cantidad de elementos tóxicos (De esparza, et al, 1990). Uno de los aspectos que más influye en esta problemática a nivel de Latinoamérica es el uso indiscriminado de pesticidas, ya que el recurso agua puede contaminarse por las escorrentías provenientes de tierras de cultivo, precipitaciones atmosféricas y por vertidos domésticos. (De Esparza, et al, 1990)

Al pasar los años el ser humano se ha dado cuenta que debe preservar el medio ambiente, por lo que surge la necesidad de tratar los vertidos contaminantes que produce. Entre ellos podemos mencionar a las aguas residuales, que pueden ser de origen doméstico o urbano, industrial, y escorrentías de uso agrícola y pluvial.

Muchas aguas residuales, en especial la industriales y agrícolas, poseen una alta carga de contaminantes como son metales pesados y pesticidas, dos grandes problemas a los que se enfrenta el ser humano si desea mantener una conciencia ecológica (Ramalho, 1990, p.10).

Con el paso de los años el tratamiento de las aguas residuales ha introducido nuevos métodos de remediación de efluentes, como son los tratamientos biológicos y los métodos foto-oxidativos. Ambos surgen como una alternativa a los ya conocidos métodos físicos y químicos para el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos pesticidas. Entre los métodos biológicos encontramos a los lodos activos, digestión aerobia y anaerobia, y lagunas facultativas, entre otros.

Los procesos foto-oxidativos pueden degradar compuestos orgánicos mediante reacciones de oxidación que se inician por la interacción de especies químicas fotoexcitadas por luz ultravioleta (Lona y Tiscareno, 2000, pp.22-27), y pueden ser usadas para disminuir el tiempo de biorremediación de los tratamientos biológicos o pueden ser usadas como un método a parte para el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos pesticidas.

1.2.4. Lodos activos.

El método de lodos activos fue utilizado por primera vez en el Reino Unido en 1914, y en la actualidad constituye un método estándar de tratamiento de aguas residuales de los países del primer mundo. Por el contrario, en los países latinoamericanos no se realiza a pesar de existir el conocimiento y aplicaciones específicas para este tipo de tratamiento.

Los lodos activos como una instalación en la cual existe mezcla completa de una masa activada de microorganismos capaz de estabilizar un residuo en medio aerobio (Méndez, et al, 2004, pp.74-83).

Al producirse la degradación en ambientes aerobios, es necesario utilizar aireadores mecánicos para mantener estas condiciones.

Durante el proceso de bioestimulación se suele agregar oxígeno junto a los nutrientes que necesitan los microorganismos para favorecer el metabolismo de compuestos contaminantes. El inóculo puede ser una masa de lodos activos procedentes de una planta en operación o aguas residuales decantadas. Este inóculo es medido como sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla (SSVLM), y además es necesario medir la concentración del sustrato (S), por lo general es la demanda bioquímica de oxígeno (DBO5).

Otro parámetro importante para tener en cuenta es el tiempo de adaptación de los microorganismos o licor mezcla a los nuevos lodos activados. Una manera de favorecer o acelerar este proceso es agregando estiércol de ganado vacuno y abono de jardín (cepas biológicas), así como procurar mantener condiciones anaerobias si los lodos activos se encuentran en fosas sépticas. También hay que tomar en cuenta el tiempo que le toma a este lodo llegar a saturarse o colapsarse (Méndez, et al, 2004, pp.74-83).

1.2.5. Organismos Vivos

Los organismos vivos pueden ser identificados esencialmente por el tipo de célula. Existen dos tipos de células, procariotas y eucariotas, que se distinguen por su tamaño, organelos y tipos de estructuras internas. Las procariotas son células que carecen de núcleo y son las células más pequeñas que se conocen, más simples, arcaicas y la forma metabólica más diversa de la vida en nuestro planeta. Existen dos dominios para este tipo de células, bacterias y arqueobacterias.

Las arqueobacterias están constituidas por tres grupos de bacterias primitivas: metanógenas, halófilas y termoacidófilas, mientras que las bacterias son todas las otras bacterias que no pertenecen a las arqueobacterias y las micoplasmas. Las células eucariotas son todos los otros tipos de organismos (fungí, plantae, animalia, protista), estas son más complejas que las procariotas y su reproducción celular ocurre mediante dos procesos que son la mitosis y meiosis. Existen dos tipos: unicelulares y pluricelulares. (Andramuño, 2008, pp.27-35; Starr y Taggart, 2008, pp.56-58).

Tabla 4-1: Tipos básicos de células, resumen básico.

	Eucariontes	Eubacterias	Arqueobacterias

Tabla 4-1: Continuación

Estructura Celular	Eucariota	Procariota	Procariota
Membrana Celular			Diésteres de alcohol o
Lípidos principales	Diésteres de alcohol	Diésteres de glicerol	Tetraésteres de diglicerol
Cadena lateral	Ácidos grasos	Ácidos grasos	Alcoholes poliisopranoides
Endo- y exocitosis	+	-	-
SISTEMAS DE MEMBRANAS INTRACITOPLASMÁTICAS			
Membrana Nuclear	+	-	-
Retículo endoplasmático	+	-	-
Aparato de Golgi	+	-	-
Mitocondrias	+	-	-
Cloroplastos	+	-	-
ELEMENTOS CITOESQUELETICOS			
Microtúbulos	+	-	-
Microfilamentos	+	-	-
LA PARED CELULAR			
Contiene Mureína	-	+	-
SISTEMAS GENETICOS			
Número de cromosomas	>1	1	1
Topología del cromosoma	Linear	Circular	¿?
Número de histonas	5	1	1
Nucleosomas	Sí	Tal vez	Probablemente
Segregación cromosómica	Huso mitótico	Membrana celular	¿?

Tabla: 4-1: Continuación

Intercambio genético iniciado por:	Fusión del cigoto	Transferencia unidireccional o bidireccional de DNA	¿?
Meiosis	+	-	-
Transcripción	-	+	¿?
tRNA iniciador	Metionil-	Formilmetionil-	Metionil-
Diftamina elongación	+	-	+
Tamaño del ribosoma	80S	70S	70S

Fuente: (Stainer, et al, 1996)

Realizado Por: Edgar Uquillas 2015

1.2.5.1. Bacterias.

Las bacterias se encuentran en cada rincón de nuestro planeta: en aguas dulces y saladas, en el fondo del mar, en el hielo de los glaciares, y en animales y plantas. Estas son muy pequeñas con un tamaño de menos de una micra a 10 micras de longitud, y una anchura de aproximadamente 0.2 micras (Villey y Zarza, 1996, p. 1404). Las bacterias tienen diversas formas entre las que destacan los bacilos, cocos esféricos y formas espirales.

Las bacterias se clasifican principalmente por sus características fisiológicas y bioquímicas ya que tienen formas y estructuras parecidas. Generalmente se desplazan utilizando flagelos, se reproducen asexualmente por fisión binaria, y son saprófitas o parásitas aunque algunas bacterias también son autotróficas. Por otra parte Vargas y Villazante (2014, p.2309) indican que las bacterias pueden sub-clasificarse en: bacterias Gram negativas y Gram positivas.

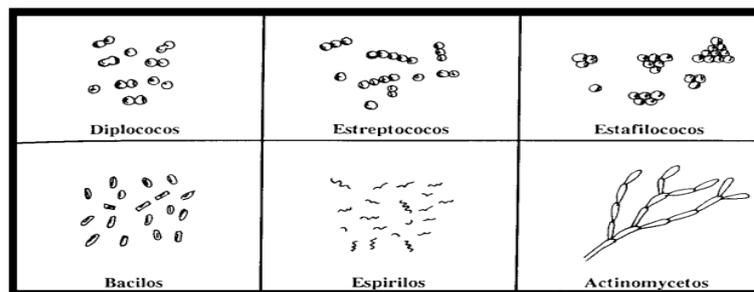


Figura 4-1. Formas y agrupaciones de las bacterias

Fuente: (Cadenas, 1995)

1.2.5.1.1. Clasificación de las bacterias.

Se propone la siguiente clasificación de las bacterias por los factores que intervienen en su crecimiento descritos por Vargas y Villazante (2014, p.2309) y Tortora et al., (2007, pp. 160-164):

Según la temperatura:

- **Termófilas:** Se desarrollan entre los 50 y 75 °C.
- **Mesófilas:** Se desarrollan entre 35 y 47°C.
- **Psicrófilas Obligados:** Se desarrollan entre 15 y 18°C.
- **Psicrófilas Facultativas:** Se desarrollan entre 20 a 30°C

Según el pH en el cual se desarrollan:

- **Acidófilos:** Se desarrollan a un pH entre 1.0 y 5.0
- **Neutrófilos:** Se desarrollan a un pH entre 5.5 y 8.5
- **Basófilos:** Se desarrollan a un pH entre 9.0 y 10.0

Según su metabolismo interno:

- **Fotoautótrofos:** Obtienen energía de la luz y su fuente de carbono es el dióxido de carbono (CO₂).
- **Fotoheterótrofos:** Obtienen energía de la luz y su fuente de carbono son los compuestos orgánicos.
- **Quimioautótrofos:** Obtienen la energía de las sustancias químicas y su fuente de carbono es el dióxido de carbono (CO₂).

Según su requerimiento de oxígeno:

- **Aerobias estrictas:** Dependen del oxígeno (O₂) para su crecimiento.
- **Anaerobios estrictos:** se desarrollan en ausencia completa de oxígeno.
- **Anaerobios facultativos:** Estos desarrollan en presencia o ausencia de oxígeno.
- **Microaerófilos:** Sólo se pueden desarrollar en presencia de bajas tensiones de oxígeno y altas temperaturas.

1.2.6. Microorganismos.

Se puede definir a los microorganismos como seres vivos de tamaño microscópico que no son visibles para el ojo humano y que están dotados de individualidad. Estos son los seres vivos que han colonizado nuestro planeta hace ya varios millones de años siendo también los más numerosos, presentando una sencillez estructural y biológica pero no fisiológica. Una de sus más grandes cualidades es que poseen la facultad de cambiar para adaptarse al medio, siendo encontrados en los polos y en los trópicos. Esto conlleva cambios hereditarios positivos o negativos, produciendo los positivos procesos evolutivos.

La homogeneidad de la población microbiana permite fenómenos o reacciones químicas en particular. Ésta y otras características vuelven a los microorganismos un sujeto ideal para la investigación de fenómenos biológicos. Entre estas características tenemos: que pueden cultivarse fácilmente, crecen rápidamente y se reproducen a un elevado ritmo. La capacidad que poseen dichos microorganismos se debe a su versatilidad bioquímica, capaz de realizar varias reacciones como son la de oxidación, reducción y precipitaciones. (Portugal, 1998, pp. 1-3)

Los factores ambientales que condicionan el crecimiento bacteriano propuestos por Polo et al., (2002, p. 109) y Cadenas (1995 p. 18) son:

- Temperatura.
- Humedad y actividad del agua.
- Oxígeno.
- pH.
- Salinidad-Conductividad
- Potencial redox
- Presión.
- Radiación.
- Movimiento.
- Espacio.
- Magnetismo.

Mientras que Tortora, et., (2007, p. 160) no indica que el crecimiento microbiano está dividido en factores físicos como la temperatura, el pH, la presión osmótica y factores químicos como la fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, oligoelementos, oxígeno y factores de crecimiento orgánicos.

Tabla 5-1: Tipos de microorganismos según su fuente de energía y carbono.

Clasificación de los microorganismos	Fuente de energía	Fuente de Carbono (sustrato)
Autótrofos		
Fotoautótrofos	Luz	Dióxido de carbono
Quimiolitotrofos	Reacciones de óxido-reducción de compuestos inorgánicos.	Dióxido de carbono
Heterótrofos	Reacciones de óxido-reducción de compuestos orgánicos.	Carbono orgánico

Fuente: (LaGrega, et al, 1996, p.644).

1.2.6.1. Métodos biológicos para el tratamiento de contaminantes.

Durante el tratamiento biológico de compuestos contaminantes se produce una degradación de un residuo orgánico por medio de la acción de los microorganismos presentes. Existe una alteración de la estructura molecular de los compuestos orgánicos y esta alteración nos indica si se ha producido biotransformación o mineralización del compuesto contaminante. Para el tratamiento biológico de compuestos contaminantes existen una serie de parámetros biológicos para tomar en cuenta (LaGrega et al. 1996, pp. 644-649)

- **Fuentes de energía y sustrato:** Al aplicar un tratamiento biológico a un contaminante este es utilizado como sustrato y se vuelve un resultado directo del metabolismo heterótrofo de los microorganismos. En otras palabras el contaminante sirve como fuente de carbono para los microorganismos.
- **Procesos enzimáticos:** Para que se realicen los procesos enzimáticos es necesario en primer lugar ingresar el sustrato al interior de la célula y esto sucede mediante tres procesos: Formación de un complejo enzima-sustrato extracelular, degradación parcial y transporte directo. Una vez que el sustrato ha ingresado a la célula, las enzimas intracelulares formarán complejos con el sustrato para catalizar otras reacciones necesarias para la obtención de energía y producción de nuevo material celular. Estas reacciones son conocidas como anabolismo y catabolismo.
- **Biodegradabilidad del sustrato:** En la naturaleza la mayoría de sustancias orgánicas que podemos encontrar son biodegradables, aunque no todas cumplen esta regla y son resistentes

a la degradación, estos compuestos son conocidos como recalcitrantes o refractarios, también podemos encontrar otro tipo de compuestos denominados persistentes estos son biodegradables pero un lapso de tiempo muy grande por lo que vuelve ineficaz el tratamiento biológico.

- **Inhibición y toxicidad:** Tanto la inhibición como la toxicidad están relacionados con la relación dosis-efecto, ya que en su mayoría los compuestos contaminantes presentan un efecto progresivo al incrementarse la concentración, Los compuestos que normalmente son biodegradados a una concentración establecida, inhiben el crecimiento microbiano cuando aumenta esta concentración, incluso si la concentración es más elevada puede ser tóxico para el cultivo microbiano.
- **Población microbiana:** La población microbiana es una compleja interacción entre los diferentes microorganismos que forman un consorcio, se torna necesario tomar en cuenta la velocidad de crecimiento y el consumo de sustrato de los microorganismos dependiendo del tipo de cultivo ya que en un cultivo mixto la velocidad de crecimiento y el consumo de sustrato será mayor que en un cultivo puro.

1.2.6.2. Microorganismos biorremediadores

Existen muchos microorganismos que son capaces de degradar compuestos tóxicos, pero también son selectivos, es decir, que usan como sustrato un contaminante en especial. En el caso concreto de la degradación de pesticidas algunos de los principales microorganismos son:

Hongos: *Thricoderma*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y algunas especies de *Mucor*, *Fusarium* y *Penicillium* (Argumedo, et al, 2009, pp.257-269; Corredor, et al, 2013, pp.119-135; Díaz, 2011, pp.5867-5882; Stamatiu, et al, 2015, pp.23-37).

Bacterias: *Pseudomonas sp.*, *Eubacterium limosum*, *Alcaligenes eutrophus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Aerobacter*. (Corredor, et al, 2013, pp. 119-135; Nuvia, et al, 2014, pp.1-1).

Tabla 6-1: Algunas enzimas y microorganismos reportados en degradación de plaguicidas.

Enzima	Microorganismo	Requerimiento de cofactor	Plaguicida que degradan	Estrategia de biorremediación empleada
Gox	<i>Pseudomonas sp. Lbr.</i>	FAD	Glifosato	En planta
	<i>Agrobacterium strain T10</i>			
Esd	<i>Mycobacterium sp.</i>	FAD y NADH	Endosulfan y endosulfato	Aún no en uso
Ese	<i>Arthrobacter sp.</i>	FMN (flavin)	Endosulfan y endosulfato	Aún no en uso
Cyp 1A1/1A2	Mamíferos (ratón)	Heme y NADH	Atrazina, norflurazon y clortoluron	En planta
Cyp 76B1	<i>Heliantus tuberosus.</i>	Heme y NADH	Linuron, clortoluron e isoproturon	En planta
P450	<i>Pseudomonas Putida</i>	Heme y NADH	Hexaclorobenceno y pentaclorobenceno	No en uso
TOD	<i>Pseudomonas Putida</i>	Fe+2 y NADH	Herbicidas trifluralinas	No en uso
E3	<i>Lucilia cuprina.</i>	No	Piretroides sintéticos e insecticidas fosfotriésteres	No en uso
OPH/Opd A	<i>Agrobacterium radiobacter.</i>	Fe+2 y Zn+2	Insecticidas fosfotriésteres	Biorremediación y enzimas libres
	<i>Pseudomonas diminuta.</i>			
	<i>Flavobacterium</i>			
LinB	<i>Sphingobium sp.</i>	No	Hexaclorociclohexano	Bioaumentación con <i>Sphingobium indicum</i>
	<i>Sphingomonas sp.</i>			
AtzA	<i>Pseudomonas sp. ADP</i>	Fe+2	Triazinas	En plantas y en bacterias

Tabla 6-1: Continuación

TrzN	<i>Nocardiodes sp.</i>	Zn+2	Triazinas	No en uso
Lin A	<i>Sphingobium sp.</i>	No	Hexaclorohexano	Bioaumentación con Sphingobium indicum
	<i>Sphingomonas sp.</i>			
TdfA	<i>Ralstonia eutropha</i>	a-ketoglutarato y Fe+2	2,4-ácido diclorofenoxiacético y herbicidas piridiloxiacetatos	En planta
DMO	<i>Pseudomonas maltophilia.</i>	NADH	Dicamba	En planta

Fuente: (Nuvia, et al , 2014)

1.2.6.2.1. Interacciones microbianas con los contaminantes.

En la actualidad existen microorganismos modificados genéticamente en el laboratorio con excelentes condiciones degradativas de contaminantes. Sin embargo estos microorganismos no tienen que desviar nuestra atención de los microorganismos presentes en ambientes naturales con una excepcional habilidad de adaptación que les permite integrar poblaciones dentro de una comunidad.

La adaptación se sustenta en parte por la adquisición por parte de los microorganismo de nuevas capacidades metabólicas, por una parte mediante mecanismos de variación genética convencional (mutación, conversión génica, duplicación, transposición) o intercambio de genes, y por otra mediante la complementación de las actividades metabólicas de los distintos grupos (Sánchez y Rodríguez, 2003, pp.12-16). Estas relaciones microbianas y su metabolismo son complementadas por el cometabolismo y/o sintrofismo.

En lo que se refiere a las interacciones microbianas con los contaminantes no se puede dejar de lado la producción de biosurfactantes y bioemulsionantes por parte de estos microorganismos. Los biosurfactantes son agentes que disminuyen la tensión superficial del agua, mientras que los bioemulsionantes estabilizan las emulsiones entre el agua y otro líquido.

La utilización de microorganismos con esta capacidad en sitios contaminados es de gran importancia porque facilitan la disponibilidad de los compuestos hidrofóbicos y porque la

biodegradabilidad de los biosurfactantes descarta los efectos potencialmente nocivos de estas moléculas. (Sánchez y Rodríguez, 2003, pp.12-16).

1.2.6.3. Obtención y aislamiento de microorganismos.

Para la obtención y el aislamiento de microorganismos se trabaja *in vitro* bajo condiciones controladas en el laboratorio. Sin embargo, hay que tomar en cuenta las condiciones con las que se trabaja, ya que los microorganismos se desarrollan en un entorno natural a ciertas condiciones de temperatura, humedad, pH y nutrientes. Éstas condiciones son descritas por LaGrega et al. (1996, pp.654-657)

- **Humedad:** El proceso de biorremediación depende de la humedad por dos razones: La primera es el desarrollo celular, y la segunda es que para especies inmóviles se necesita un medio de desplazamiento.
- **Temperatura:** La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes ya que tiene una influencia directa sobre la velocidad de crecimiento.
- **pH:** La importancia del pH recae en la actividad enzimática, ya que ésta enzimática varía de acuerdo al pH. Por ende el crecimiento microbiano también depende del pH.
- **Sólidos disueltos totales:** Este factor puede afectar directamente al tratamiento biológico en medio líquido, dado que si la concentración de sólidos disueltos totales es muy alta, los microorganismos mueren por ruptura osmótica de su membrana celular.
- **Nutrientes:** El metabolismo de los microorganismos requiere de varios nutrientes para cumplir con su función. Entre estos se puede mencionar al carbono orgánico total, fósforo y nitrógeno que son macronutrientes. Hay una regla empírica que es utilizada para establecer una relación entre el C, N y P (100: 5: 1 respectivamente). Además los microorganismos necesitan de micronutrientes.

Antes de aislar los microorganismos de nuestro interés primero debemos contar con un medio de cultivo donde éstos se puedan desarrollar. Muchos microorganismos crecen en casi cualquier medio de cultivo, pero otros necesitan medios de cultivo especiales. El medio de cultivo cuando es sólido posee agar, y este puede ser vertido en tubos o en cajas petri. En el primer caso deben ser colocados con cierto ángulo para su solidificación y se los denomina tubos en pico de flauta o inclinados (Tortora, et., 2007, p. 168).

Para aislar microorganismos de ambientes naturales se han diseñado diversos métodos. Esto permite cultivarlos bajo condiciones artificiales en un medio de cultivo, en los que se pueden

hallar varias colonias de microorganismos distintos. Cuando se dan estas condiciones el cultivo se denomina cultivo mixto. Si se aísla a un microorganismo en especial y solo encontramos a este microorganismo en un medio de cultivo se lo denomina puro o axénico. Para cultivar estos microorganismos es necesario la utilización de dispositivos para la transferencia de muestras microbianas.

Podemos mencionar a los hisopos, asas y pipeta de uso microbiológico. Cuando se trabaja con microorganismos siempre debemos asegurarnos de seguir una técnica aséptica, la cual nos ayudara a prevenir una posible contaminación de nuestro medio de cultivo y así asegurar la salud del investigador.

El método de aislamiento más difundido a nivel mundial es el método de siembra por estría en placa, este método funciona muy bien cuando el microorganismo de interés se encuentra en grandes cantidades. Si el microorganismo que nos interesa se encuentra en pequeñas cantidades es necesario primero someterlo a un preenriquecimiento en un medio de cultivo selectivo y así poder aislarlo del resto de microorganismos (Tortora, et al., 2007, p. 173)

Tabla 7-1: Medios de cultivo.

Tipo	Objetivo
Químicamente definido	Crecimiento de quimioautótrofos y fotoautótrofos; ensayos microbiológicos.
Complejo	Crecimiento de la mayoría de los microorganismos quimioheterótrofos.
Reductor	Crecimiento de anaerobias estrictas.
Selectivo	Supresión de microorganismos no deseados; favorece el crecimiento de los microorganismos deseados.
Diferencial	Diferenciación de colonias de los microorganismos deseados de otras.
De enriquecimiento	Similar al medio de selectivo pero destinado a aumentar la cantidad de microorganismos deseados hasta niveles detectables.

Fuente: (Tortora, et al., p. 173)

Para sembrar microorganismos están definidos varios métodos y estos son:

- Método de siembra por estría.
 - a. Estriado Simple.
 - b. Estriado en cuadrantes
- Método de vertido en placa y extensión en placa.
- Método de siembra por dilución.
 - a. Siembra en medio líquido
 - b. Siembra en medio semisólido



Figura 5-1. Método de siembra por estría en placa para el aislamiento de cultivos bacterianos puros.

Fuente: (Tortora, et al., 2007, p. 173).

1.2.6.4. Medición del crecimiento microbiano.

En la medición del crecimiento bacteriano existen varios métodos que pueden utilizarse, estos pueden ser indirectos o directos siempre y cuando se traten de muestras pequeñas, y determinar el número de células o la masa total de la población, Tortora, et al., (2007, pp. 178-179) nos indica los siguientes métodos para la medición del crecimiento microbiano.

- Recuentos en placa: Diluciones seriadas, Placa vertida y diseminación en placa.
- Filtración.
- Método del número más probable (NMP)
- Recuento microscópico directo.
- Turbidimetría.
- Actividad metabólica.
- Peso Seco.

1.2.6.5. Métodos de conservación de muestras con microorganismos.

Para conservar los microorganismos aislados, existen varios métodos: método de conservación a largo plazo, mediano plazo y corto plazo. Estos tres métodos tienen que asegurarnos la conservación de nuestras cepas. En el primer grupo tenemos las técnicas de conservación por congelación en un rango de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilización. Estas técnicas minimizan al máximo el daño de nuestras cepas por cambio en el genoma de los microorganismos y mantiene las muestras viables por un período de 10 o más años, siendo su único inconveniente el alto costo que representa conservarlas.

El segundo grupo corresponde a las técnicas de conservación de mediano plazo, entre los que tenemos la técnica de desecación, almacenamiento en tierra, conservación en aceite mineral y suspensión en agua estéril. En este tipo de técnicas la muestra se mantiene viable en un período de 2 a 5 años. El último grupo de conservación de muestras es el de corto plazo siendo el método de resiembra periódica el más conocido.

Este método implica muchas desventajas, ya que las probabilidades de contaminación de la muestra se incrementa con cada resiembra, así como la posibilidad de cambio genético de los microorganismos varía de generación en generación, pudiendo presentarse unas características muy diferentes al final de las resiembras que las presentadas al inicio del aislamiento. Otro problema que se presenta en este método es la desecación del agar, lo cual nos obliga a resembrar continuamente, aumentando los costos y apilando una gran cantidad de cajas Petri (Aleman, et al, 2005, pp.1-4).

1.2.6.6. Identificación de microorganismos.

1.2.6.6.1. Tinción de Gram

La tinción de Gram fue inventada por el bacteriólogo Hans Christian Gram en 1884, y es conocida como una tinción diferencial ya que esta divide a las bacterias en dos grandes grupos: las bacterias Gram positivas, que pueden poseer un color violeta o morado, y las Gram negativas, que pueden poseer un color rojo o rosado.

Tortora, et al., (2007, pp. 69-70) nos indica que el procedimiento básico de la tinción de Gram es el siguiente:

1/ Se cubre con un colorante violeta básico un extendido fijado sobre una placa con calor, generalmente con violeta de genciana, siendo este un colorante primario.

2/ Tras un breve periodo de tiempo se escurre y se lava el violeta de genciana del extendido y se lo cubre con yodo, una vez lavado el yodo tanto las bacterias Gram positivas como Gram negativas aparecen de un color violeta oscuro.

3/ El siguiente paso consiste en lavar el extendido con alcohol o con una solución de alcohol cetona, esta solución actúa como decolorante eliminando el color violeta de las células de una especie pero no de otras.

4/ Finalmente se lava el alcohol cetona, y se cubre el extendido con safranina el actúa como un colorante básico, porque las células que se mantuvieron teñidas con el color violeta no absorben el color rojo pero aquellas que si se decoloraron con la solución de alcohol cetona absorben este colorante, se vuelve a lavar el extendido, se lo deja secar sobre papel absorbente y se lo observa con ayuda del microscopio.

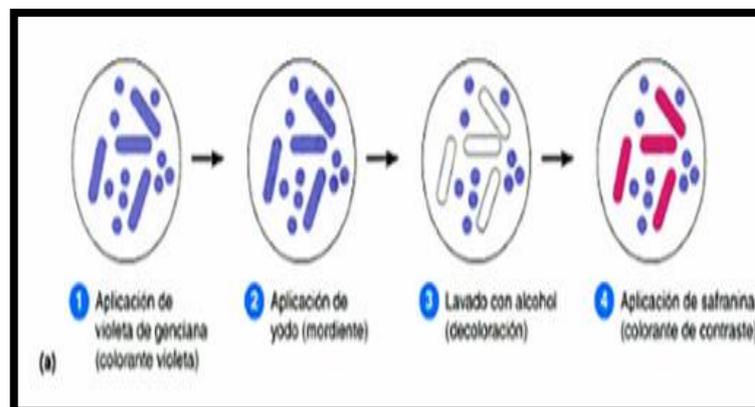


Figura 6-1. Tinción de Gram

Fuente: (Tortora, et al., 2007)

1.2.6.6.2. *Kit Microgen GN-ID para identificación de microorganismos aislados*

El kit Microgen GN-ID es propiedad de la compañía Microgen bioproducts Ltd (2013), este kit comprende dos tiras de micropocillos (GN A y GN B), cada tira está comprendida por 12 substratos bioquímicos estandarizados para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y microorganismos Gram negativos, oxidasa positivos y negativos.

Las tiras GN A se pueden utilizar individualmente, mientras que las tiras GN B fueron diseñadas para utilizarse junto a las tiras GN A obteniendo de esta manera 24 substratos para la identificación bioquímica de los microorganismos utilizados durante esta investigación.

1.2.6.6.3. Bioensayos

Los Bioensayos son utilizados para determinar la toxicidad de un elemento o compuesto sobre la supervivencia de un organismo, utilizando métodos estadísticos como son el análisis para sustentar la información registrada. Últimamente uno de los indicadores más utilizados para determinar la toxicidad es la dosis o concentración más alta a la cual no se observa ningún efecto (NOEC), y la dosis letal media conocida como (DL₅₀) donde el 50% de microorganismos mueren a dicha concentración.

Las pruebas de toxicidad o bioensayos involucran a un agente o estímulo, como por ejemplo un pesticida o un metal pesado, aplicado sobre un organismo o un grupo de organismos conocido como sujeto. Este tipo de pruebas suelen diseñarse aplicando distintas dosis y se comparan con una preparación estándar o control (Castillo, 2004, pp. 99-110).

1.2.6.6.4. Interacciones Microbianas

Las interacciones microbianas se dan por la estrecha relación entre los microorganismos presentes en la naturaleza. Estos rara vez se encuentran aislados y forman un equilibrio ecológico en el lugar en el cual se desarrollan. La capacidad para mantener este equilibrio en un medio ambiente cambiante se llama homeostasis. Dos o más poblaciones pueden interactuar entre sí con 3 resultados: neutralismo (es más evidente in vitro y no se observa ningún efecto visible), sinergismo (cuando las poblaciones se benefician mutuamente) y antagonismos (cuando una población inhibe el crecimiento de otra) (Frioni, 1999, pp.169-178).

CAPITULO II

2. MARCO METODOLOGICO

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Tipo y diseño de Investigación

Esta investigación es experimental de tipo transversal que busca vincular la relación entre la variable dependiente (crecimiento de microorganismos) y la variable independiente (concentraciones de organofosforados).

2.1.2. Unidad de análisis

La unidad de análisis en esta investigación será el agua residual producida durante las operaciones del centro de acopio-Guaslán, los lodos activos donde estas son descargadas y los pesticidas proporcionados por el M.A.G.A.P.

2.1.3. Población de Estudio

La población de estudio es la fosa séptica que se encuentra en el centro de acopio-Guaslán

2.1.4. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra corresponde a 1 litro de agua residual para realizar los análisis físico-químicos, tanto del afluente como del efluente, además 2 kilogramos de fangos activos para los análisis físico-químicos.

2.1.5. Selección de la muestra

La selección de la muestra para la recolección de las aguas residuales, se realizó bajo los criterios técnicos establecidos en el Manual de métodos analíticos para la determinación de parámetros fisicoquímicos básicos en aguas. (Severiche, et al, 2013, p.8)

Siguiendo este procedimiento:

- 1) Definición del plan de muestreo.
- 2) Ejecución del muestreo
- 3) Determinación de parámetros in situ.
- 4) Conservación y almacenaje.

La selección de la muestra para la recolección de los lodos activos presentes en el centro de acopio Guaslán se realizó bajo los criterios técnicos estipulados en el Manual de disposición de aguas residuales, punto 7. 1. Muestreo de agua y lodos residuales. (Czyszz, et al, 1991, pp.871-872)

El procedimiento realizado se describe a continuación:

- 1) Toma de muestras.
- 2) Homogenización de la muestras.
- 3) Conservación y almacenamiento.

2.1.5.1. Sitio de experimentación.

El centro de acopio perteneciente al (M.A.G.A.P) donde se tomaron las muestras para esta investigación se encuentra ubicado en la vía principal que comunica a la ciudad de Riobamba con Macas, a 6Km de Punín, en la Parroquia Rural San Luis del Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo. Las temperaturas medias anuales de dicho centro de acopio oscilan entre 18° C a 21 °C, datos proporcionados por la estación meteorológica-GUASLAN M0133 del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI).

Tabla1-2: Coordenadas geográficas del centro de acopio Guaslán, UTM WGS84 ZONA 17 S.

Puntos	X	Y
Punto 1	0761611	9807997

Tabla 1-2: Continuación

Punto 2	0761568	9808004
Punto 3	0761570	9808062
Punto 4	0761617	9808062

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015).



Figura 1-2. Fotografía de la ubicación del centro de acopio Guaslán

Fuente: Google Earth, 2015.

2.1.5.2. Materiales a emplear

Durante el muestreo de lodos.

- Balanza.
- Cooler con hielos para el transporte muestras.
- Costales vacíos sin uso.
- Fundas plásticas con cierre hermético de 1 Kilogramo.
- Marcador permanente.
- Muestreador de lodos
- Pala.

Durante el muestreo de agua.

- Cooler con hielos para el transporte de muestras.
- Cronómetro.

- Envase aforado de al menos 5 litros.
- Envases estériles para la toma de muestras biológicas.
- Envases plásticos de 1 Litro para muestras físico químicas.
- Marcador permanente.

Durante la fase experimental llevada a cabo en el laboratorio.

Materiales	Reactivos
Agitador magnético con calefacción.	- Aceite de inmersión
Asa metálica.	- Agua destilada.
Balanza analítica.	- Alcohol potable.
Cajas Petri.	- Glicerol.
Cámara de flujo laminar.	- Agar nutritivo.
Esterilizadora.	- Agar – Agar.
Fundas de esterilización.	- Agar extracto de malta.
Gradilla para tubos.	- Agar extracto de levadura.
Hisopos estériles.	- Pesticidas comerciales.
Incubadora.	- Alcohol cetona
Kit de identificación microbiana.	- Safranina
Matraces Erlenmeyer.	- Violeta de Genciana
Mechero bunsen.	- Lugol
Medicamento anti fúngico de 200 mg.	- Rosa de bengala.
Micropipeta de 100 uL.	
Microscopio.	
Placa portaobjetos.	
Tubos con tapa rosca esterilizables.	

2.1.6. Análisis e interpretación de la información.

Para la interpretación de la información resultante de los bioensayos, se realizó un análisis estadístico de comparación de medias, ANOVA de un factor para validar:

- Si el crecimiento bacteriano es dependiente de la concentración.
- El crecimiento bacteriano es dependiente del tipo de bacteria.

2.2. Obtención de microorganismos a partir de muestras de lodos.

2.2.1. Sitio de muestreo para la obtención de microorganismos.

La toma de muestras de lodos para la obtención de microorganismos se realizó en la fosa séptica ubicada dentro del centro de acopio- Guaslán, perteneciente al M.A.G.A.P a una altitud promedio de 2740 m.s.m.

Tabla 2-2: Coordenadas geográficas del sitio de muestreo de lodos, UTM WGS84 ZONA 17 S.

Puntos	X	Y
Punto 1	761627	9808053
Punto 2	761627	9808055
Punto 3	761630	9808055
Punto 4	761630	9808053

Realizado por: Edgar Uquillas, 2015.



Figura 2-2. Fotografía de la ubicación del sitio de muestreo de lodos señalada en verde dentro del centro de acopio-Guaslán.

Fuente: Google earth, 2015.



Figura 3-2. Plano de descarga de aguas del centro de acopio-Guaslán.

Realizado Por: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador.

2.2.2. Procedimiento

Para la obtención de microorganismos a partir de muestras de lodos en la fosa séptica ubicada en el centro de acopio Guaslán, se usó como guía los criterios técnicos estipulados en el Manual de disposición de aguas residuales, punto 7. 1. Muestreo de agua y lodos residuales. (Czyszz, et al, 1991, pp.871-872)

El primer paso consistió en la determinación de la profundidad en todos los puntos pre-seleccionados para el muestreo, arrojando diferentes datos en cada punto, por lo que fue necesario homogenizar la muestra. La toma de muestras en los 8 diferentes puntos se realizó a una misma profundidad (5cm) con relación a la parte inferior de la fosa séptica, con la ayuda de un muestreador de lodos, a excepción del punto 8 dado que su profundidad imposibilitaba el muestreo.

Se procedió a extraer aproximadamente 1 Kilogramo de cada punto, 500 gramos fueron empacados en una funda con cierre hermético debidamente rotulada y los otros 500 gramos se utilizaron para preparar una muestra compuesta. Ésta fue dividida en 4 cuadrantes en costales vacíos o limpios para su volteo, se tomó dos de ellos al azar para continuar con la homogenización de la muestra, y los otros dos fueron regresados a la fosa séptica.

Se repitió el mismo proceso hasta obtener una cantidad aproximada de 500 gramos, para rotular esta muestra como el punto 9. Todas las muestras fueron conservadas a una temperatura inferior a los 4°C y utilizadas para los análisis pertinentes en un plazo no mayor a las 24h a partir del muestreo.

Tabla 3-2: Profundidades determinadas en cada punto de muestreo pre-seleccionado.

PUNTO	PROFUNDIDAD DE MUESTREO
Punto 1	14 cm
Punto 2	13 cm
Punto 3	15 cm
Punto 4	12 cm
Punto 5	7 cm
Punto 6	8 cm
Punto 7	8cm
Punto 8	6 cm

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015).

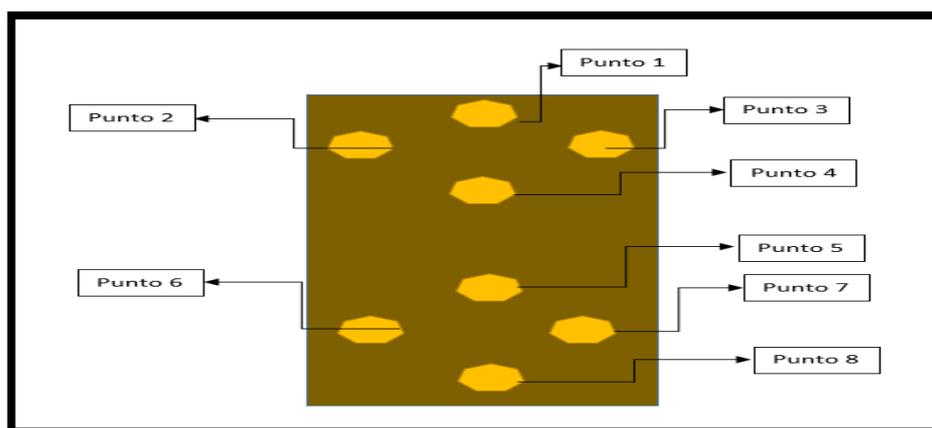


Figura 4-2. Puntos de muestreo para la obtención de microorganismos en la fosa séptica ubicada dentro del centro acopio-Guaslán
Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

2.3. Análisis de laboratorio

Los análisis físico-químicos del efluente de aguas residuales del centro de acopio-Guaslán, el afluente de dichas agua liberado al medio y lodos se realizó en el laboratorio CESSTA (ESPOCH), comprendiendo los análisis de pesticidas organofosforados. Además se tomaron *in situ* los análisis de: TDS, C.E, T° y pH para el efluente de aguas residuales liberado en la fosa séptica y el afluente liberado al medio. Los análisis de los lodos activos se llevaron a cabo en el laboratorio de suelos de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH y los parámetros analizados fueron: pH, % materia orgánica, textura, relación carbono/nitrógeno, humedad, carbono orgánico, nitrógeno, fósforo y potasio.

2.4. Obtención y aislamiento de microorganismos en el laboratorio

2.4.1. Preparación de los medios de cultivo.

El primer paso consiste en preparar diluciones seriadas de los microorganismos presentes en lodos de la fosa séptica ubicada en las inmediaciones del centro de acopio-Guaslán. Para esta práctica se esterilizaron 9 frascos con 90ml de agua destilada, uno por cada muestra de suelo, y se agregaron 10g de cada muestra de suelo en cada tubo, de esta manera se obtuvo una dilución 1:10 o 10^{-1} por cada muestra de suelo.

Tras concluir con este proceso se tomó una alícuota de 1ml de todas las muestras madre anteriormente preparadas y se colocó en frascos estériles con 9 ml de agua destilada, de esta manera se obtiene una de dilución de 1:100 o 10^{-2} por cada muestra de suelo. Posteriormente, se

tomó un 1ml de dilución 10^{-2} y se la colocó en otro frasco estéril con 9 ml de agua estéril obteniendo una dilución 10^{-3} . Estas diluciones se realizaron sucesivamente hasta obtener una dilución final de 10^{-7} . Se escogieron dos diluciones por presentar mayor crecimiento pero no excesivo, y estas fueron la dilución 10^{-4} y 10^{-5} .

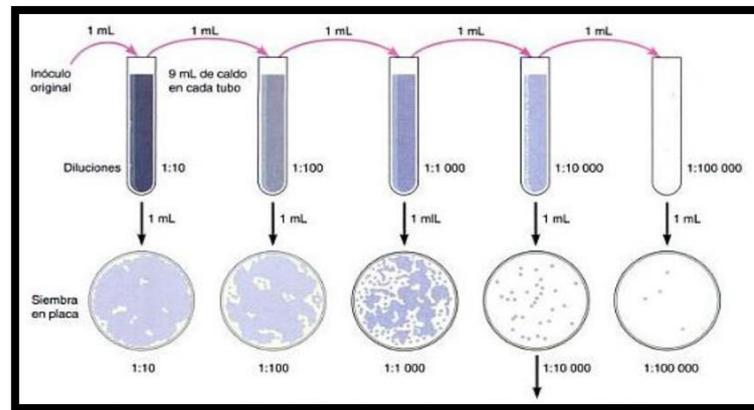


Figura 5-2. Recuentos en placa y diluciones seriadas
Fuente: (Tortora, et al., p. 179)

Una vez realizado el número de diluciones se procedió a preparar los medios de cultivo, con un simple cálculo, se múltiplo el número de diluciones (2) por el número de medios de cultivo (3) dando un valor de 6, y este resultado se multiplicó por el número de muestras (9). Obteniéndose un valor global de 54, es decir, es necesario preparar medio de cultivo suficiente para 54 cajas Petri. Los medios de cultivo fueron pesados y colocados en matraces Erlenmeyer de 500 ml, utilizando una técnica propia del laboratorio de recursos naturales de la ESPOCH utilizándose la siguiente tabla para la preparación de cada medio de cultivo.

Tabla 4-2: Reactivos para la preparación de medios de cultivos

PDA	19,5 g	500 ml H ₂ O
Agar-nutritivo	11,5 g	
Agar-Agar	7,5 g	
Rosa de bengala	0,02 g	
Extracto de malta	2,5 g	
Extracto de levadura	2,5 g	

Fuente: Ing. Norma Erazo

Mediante esta tabla se prepararon los medios de cultivo: Agar Nutritivo, Agar Gym y Agar PDA según los siguientes valores:

- Agar nutritivo: se utilizaron 9,2 g
- Agar Gym: mezcla de Agar-Agar 6g, extracto de malta 2g y extracto de levadura 2g
- Agar PDA se utilizaron 15,6 g.

Cada Agar se mezcló con 400 ml de H₂O. Adicional se agregó 0,016 g de Rosa de bengala al frasco que contenía Agar PDA para evitar el crecimiento de bacterias. Se procedió a esterilizar los 3 agares a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Tras concluir la esterilización se agregó 1 cápsula de Nystatin al Agar nutritivo para evitar el crecimiento de hongos. Después de tener listo el Agar se vertió en la placas Petri, usando un mechero bunsen dentro de una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación. Se rotularon las cajas de acuerdo al número de muestra, dilución, medio de cultivo que poseía y se procedió a solidificar el Agar durante un periodo de 24 horas.

2.4.2. Siembra y conteo de microorganismos

Tras comprobar que el agar se había solidificado satisfactoriamente se procedió a inocular en distintas placas de Petri 1ml de las diluciones 10⁻⁴ y 10⁻⁵. Para la muestra de lodo 1 se usó, agar nutritivo, agar Gym y agar PDA, se repitió el proceso para la muestra de lodo 2 y así sucesivamente hasta llegar a la muestra de lodo 9. Con ayuda de rastrillos estériles se extendieron los inóculos por toda la caja Petri Las cajas fueron incubadas durante 24 h a una temperatura constante de 35°C, y se comprobó el crecimiento en todas las placas Petri.

Se escogió trabajar con las cajas inoculadas con la dilución 10⁻⁴ porque presentaban un mejor crecimiento en cuanto al agar nutritivo y agar Gym se refiere. En ninguna caja Petri con las dos diluciones que se trabajo hubo crecimiento de hongos por lo tanto se descartaron las cajas con agar PDA Este resultado era el esperado ya que lo hongos son principalmente aerobios y en los lodos activos predominan los microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos.

Finalmente se realizó el recuento de microorganismos en todas las cajas Petri, utilizando la técnica de recuento en placa sugerida por Tortora et al. (2007, p.178) para determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Este método consiste en contar todas las colonias visibles que han crecido en la caja Petri, tomando en cuenta que solo las cajas que presenten un crecimiento entre 25 a 250 colonias pueden ser contadas y expresadas en UFC. Para este método se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{\# de colonias por placa} \times \text{el factor de dilución (inversa de la dilución)}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

Fuente: (Tortora, et al., 2007)

2.4.3. Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento de microorganismos se prepararon 40 cajas Petri de Agar nutritivo y 40 cajas Petri de Agar Gym utilizando el método de siembra por estría, una caja para cada microorganismo diferente que fue aislado (Tortora, et al., 2007, pp. 160-179). Las cajas Petri pueden contener un volumen aproximado de 15 a 20 ml, esto quiere decir que para preparar 40 cajas Petri con 20 ml necesitaríamos 800 ml por cada tipo de Agar que fuese necesario utilizar. En cuanto al Agar nutritivo, se utilizaron 9,2g en 400 ml de H₂O destilada, y para el agar Gym se utilizaron 6g de Agar-Agar, 2g de Agar extracto de levadura y 2g de Agar extracto de malta en 400 ml de H₂O destilada.

El proceso se repitió obteniendo 800 ml de cada Agar utilizado. Se procedió a verter el agar en las cajas de Petri previamente rotuladas y se dejó solidificar por un periodo de al menos 12 h. Para asegurar la asepsia del procedimiento se limpió la cámara de flujo laminar completamente con alcohol y se encendió la luz ultravioleta por un periodo no menor a 30 minutos antes de realizar el proceso. Después de cumplir con estos estándares, se encendió el mechero bunsen para flamear el asa, se dejó enfriar por algunos segundos, se tomó un pequeño inóculo de la colonia elegida para aislar y se procedió a la siembra.

Este último procedimiento se repitió para cada bacteria que se necesitaba aislar. Una vez concluida la siembra, se ponen a incubar las muestras por un período de 24 horas. Concluido este tiempo ya se pueden observar los microorganismos aislados. Se escogieron 20 cajas Petri con agar nutritivo y 20 cajas con agar Gym que poseían microorganismos aislados y presentaban el mejor crecimiento.

2.4.4. Conservación de microorganismos

Para su conservación es necesario hacer dos réplicas de los microorganismos previamente aislados, una réplica será utilizada para la conservación de los microorganismos y la otra réplica será utilizada para realizar una tinción Gram. Este procedimiento es utilizado para evitar la contaminación de las muestras y mantener las muestras lo más puras posibles. Para las réplicas se utiliza el mismo procedimiento descrito anteriormente sobre aislamiento de microorganismos.

Las cajas Petri se dejan incubar por un período de 24 horas. Durante este lapso se preparan los tubos inclinados que conservaran la muestra. Se inicia con la preparación de los medios de cultivo Agar nutritivo y Agar Gym. Para esto se debe tomar en cuenta que cada tubo necesita 6 ml de

medio cultivo y por cada medio de cultivo se deben preparar 20 tubos. La cantidad justa que se necesita de ambos medios de cultivo es de 120 ml pero se prepararon 130 ml para evitar inconvenientes. Para obtener esa cantidad se utilizaron 2,99g de agar nutritivo, mientras que para el agar Gym se utilizaron 1,95g de Agar-Agar, 0.65g de agar extracto de malta y 0.65g de extracto de levadura. Una vez preparados los medios de cultivo estos se colocan en un agitador magnético con calefacción hasta observar la ebullición de los mismos.

Una vez observada la ebullición, se toma una alícuota de 6 ml de Agar nutritivo o Agar Gym y se coloca en un tubo con tapa rosca previamente etiquetado. Se repite el mismo procedimiento hasta completar los 20 tubos que contendrán Agar nutritivo y los 20 tubos con Agar Gym. Posteriormente se esterilizan los tubos con medio de cultivo a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Tras la esterilización los tubos se colocan en bandejas especiales con un ángulo que mantiene inclinados los tubos, y se deja solidificar el agar durante al menos 12 h. Una vez que los microorganismos han sido incubados y el Agar se ha solidificado se procede a la siembra en la cámara de flujo laminar. Se toma un pequeño inóculo con el asa metálica previamente flameada con la ayuda de un mechero bunsen y con un estriado simple se siembra dentro del tubo. Tras este procedimiento se flamea 3 a 5 veces la boca del tubo para evitar cualquier tipo de contaminación. Se repite el procedimiento para todos los tubos que estén preparados con Agar.

Una vez finalizado este proceso se incuban los microorganismos durante 24h. Al finalizar este proceso se agrega aceite mineral hasta tapar todo el Agar de los tubos inclinados para posteriormente dejarlos en refrigeración. Este método de preservación nos asegura la conservación de nuestros microorganismos aislados durante un lapso de tiempo que varía de 3 a 5 años.

2.5. Caracterización primaria de los microorganismos aislados

2.5.1. Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica de las bacterias se procedió a identificar los siguientes aspectos:

- 1) Color
- 2) Elevación

- 3) Forma de la colonia
- 4) Margen

2.5.2. Tinción de Gram

El procedimiento utilizado para esta investigación siguió los lineamientos establecidos por Tortora et al. (2007, pp. 160-179) y es el siguiente:

- 1) Colocamos una gota de agua destilada sobre la placa porta objetos.
- 2) Flameamos el asa metálica, se deja enfriar, se toma un pequeño inóculo de la colonia bacteriana deseada y se realiza un frotis amplio sobre la placa porta objetos.
- 3) Esperamos unos segundos y flameamos rápidamente 3 veces la placa porta objetos para fijar la muestra.
- 4) Empapamos el porta objetos que contiene nuestra muestra fijada con violeta de genciana y esperamos 60 segundos para enjuagar toda la placa con ayuda de una pipeta llena de agua destilada.
- 5) Empapamos la placa porta objetos con Lugol y esperamos 60 segundos para proceder con el enjuague tal y como se describió en el punto anterior.
- 6) Empapamos la placa porta objetos con alcohol cetona para decolorar la muestra hasta que no se pueda observar color violeta en el lavado. Una vez que se deje de observar color violeta nos detenemos inmediatamente y enjuagamos con agua destilada la placa porta objetos.
- 7) Empapamos la placa porta objetos con Safranina y esperamos al menos 45 segundos antes de proceder con el enjuague de la placa porta objetos.
- 8) Se deja secar la placa porta objetos al aire preferentemente sobre papel absorbente.
- 9) Una vez que la placa porta objetos este completamente seca limpiamos su lado posterior con un poco de alcohol (esto nos ayudara a visualizar mejor la muestra).
- 10) Identificamos la bacterias con ayuda de un microscopio, utilizando el 100 x y aceite de inmersión.

2.5.3. Prueba de la catalasa

Para la prueba de la catalasa se siguieron sencillos lineamientos establecidos por Madigan et al. (2003, pp. 151-624) para una primera diferenciación de los microorganismos aislados, y son los siguientes:

- 1) En primer lugar se toma una colonia pura con la ayuda de un asa metálica o un palillo estéril.
- 2) Se agrega una gota de H₂O₂ al 30% en una placa porta objeto y se realiza un frotis sobre la misma con la ayuda del asa metálica o palillo estéril que contenga la colonia aislada.
- 3) Finalmente se observa si existe la formación de burbujas lo que nos indica que el resultado es positivo, y si no hay formación de burbujas el resultado es negativo.

2.5.4. Prueba de la oxidasa

La prueba de la oxidasa es el primer paso para la identificación de los microorganismos aislados en esta investigación. Para esta prueba se utilizaron tiras de oxidasa marca Hardy. Estas tiras poseen varias ventajas sobre el método tradicional ya que presentan una detección rápida y sencilla de la enzima citocromo-oxidasa, no necesita calibraciones ni un largo tiempo de espera para la identificación microbiológica, y las tiras tienen impregnadas en sus almohadillas el reactivo de Kovac's el cual reacciona con la muestra directamente.

Si las almohadillas toman un color púrpura o negro en un lapso menor a los 30 segundos la muestra es oxidasa positiva, si supera los 30 segundos y permanece incoloro la muestra es oxidasa negativa.

2.6. Identificación bioquímica de microorganismos aislados kit Microgen GN-ID

2.6.1. Procedimiento-inoculación e incubaciones

- 1) El primer paso es realizar un test de oxidasa por cada organismo aislado.
- 2) Una única colonia de un cultivo de 18-24 horas tienen que ser emulsificada en 3-5 ml de solución salina estéril al 0.85%.
- 3) Es necesario retirar la lámina adhesiva que cubre los micropocillos sin desecharla.

- 4) Se añade aproximadamente 100 uL de suspensión bacteriana a cada pocillo.
- 5) Es necesario enumerar los pocillos, empezando por la tira GN A, desde la etiqueta final, y revestir los pocillos 1, 2, 3, 20 y 24 con 3-4 gotas de aceite mineral.
- 6) Sellar los pocillos con la cinta adhesiva e incubar a 35-37 °C.
- 7) Las tiras GN A y GN B se leerán después de transcurridas 18 – 24 horas para las *Enterobacteriaceae* y transcurridas 48 horas para los microorganismos que dan positivo para la oxidasa.

2.6.2. Procedimiento-lectura y adición de reactivos

- 1) El primer paso para este proceso consiste en retirar la cinta adhesiva que cubre los pocillos y anotar todas las reacciones que resulten positivas con la ayuda de la carta de color incluida en kit Microgen GN-ID.
- 2) Se debe añadir 2 gotas de reactivo de Kovac`s al pocillo y leer y anotar los resultados después de 60 segundos, y añadir 1 gota de reactivo VP1 y 1 gota de reactivo VP2 al pocillo 10, leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos. Anadir 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12, leer y anotar transcurridos 60 segundos.
- 3) Realizar el test de reducción de nitrato en el pocillo 7. Después de leer y anotar el resultado del test ONPG, se añade una gota de nitrato a y una gota de nitrato b al pocillo y leer después de 60 segundos.
- 4) Procedemos anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada junto al kit Microgen GN – ID.
- 5) Finalmente se identifica al microorganismos aislado introduciendo el código octal (hoja de resultados) con la ayuda del software Microgen Identification System (MID-60) proporcionado junto con el kit Microgen GN –ID.

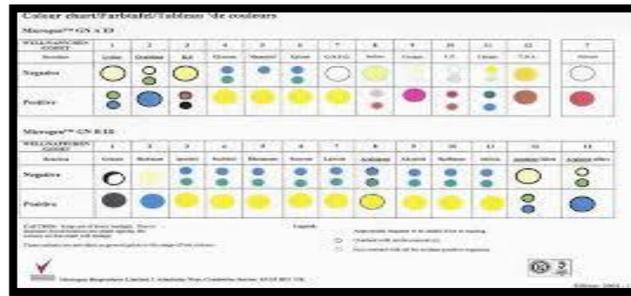


Figura 6-2. Tabla de color, kit microgen GN – ID
Fuente: Microgen Bioproducts Ltd (2013)

2.7. Bioensayos con pesticidas organofosforados

2.7.1. Selección de pesticidas que se aplicaran en los bioensayos

La selección de los pesticidas que se aplicaron en los bioensayos realizados en esta investigación fue a partir de una base de datos suministrada por el M.A.G.A.P, donde se detallaba el tipo de pesticida y la cantidad utilizada del mismo. Esta investigación se concentraba únicamente en el uso de pesticidas organofosforados, por lo que se escogió a los 3 pesticidas organofosforados de mayor uso y venta libre en el mercado local, identificados utilizando la base de datos suministrada por el M.A.G.A.P. Estos fueron: Pyrinox Plus (kañon), Profenofos (curacron) y Acefato.

Tabla 5-2: Pesticidas suministrados por el M.A.G.A.P.

Pesticida	Unidad	Cantidad	Tipo	Nombre Comercial	Peligrosidad
Pyrinox plus	L	18314,75	Organofosforado	Kañon	Dañino
Decis	L	11305	Piretroide	-	Dañino
Acefato	Kg	8924	organofosforado	Acefato	Ligeramente peligroso
Amitraz	L	7511,25	Amidina	-	Dañino
Imidacloprid	L	5428	Neonicotinoide	-	Dañino
Tracer	L	3152,1	Origen natural	Spinosad	P.n.n.o.pel
Profenofos	L	2184	organofosforado	Curacron	Dañino
Cipermetrina	L	2000	Piretroide	-	Muy peligroso
Fipronil	L	1048,2	Fenilpirazola	-	Muy Peligroso
Metomil	Kg	1,5	organofosforado	Agronnate	Tóxico

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. (M.A.G.A.P)

Realizado por: (Edgar Uquillas, 2015)

2.7.2. Preparación de medios de cultivo a diferentes concentraciones de pesticidas

Los medios de cultivo fueron preparados de manera regular. Tras la esterilización se procedió a introducir en el medio de cultivo la concentración deseada de pesticida, siempre teniendo en cuenta que la temperatura del Agar debía ser inferior a 50°C para evitar la modificación de las propiedades de los pesticidas. Se prepararon 4 medios de cultivo Agar nutritivo y 4 medios de cultivo Agar Gym.

Las concentraciones con las cuales se realizaron los bioensayos fueron: 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm y 2 ppm. Estas concentraciones fueron colocadas una por una en Agar nutritivo y Agar Gym, dando como resultado 4 medios de cultivo agar nutritivo a concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 2 ppm, y 4 medios de cultivo Agar Gym a concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 2 ppm.

2.7.3. Bioensayos aplicados a los microorganismos aislados

Para los bioensayos se utilizaron 4 experimentos, cada uno de ellos formado por dos medios de cultivo (Agar nutritivo y Agar Gym) a 4 diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1 y 2 ppm). Se sembraron los microorganismos aislados, con anterioridad, en cajas Petri debidamente rotuladas que fueron incubadas por 48 horas. Tras este tiempo se comprobó el crecimiento de microorganismos a las diferentes concentraciones de pesticidas a las que fueron sometidos con la finalidad de escoger los microorganismos que posteriormente serán sometidos a una prueba de interacción microbiana.

2.7.4. Prueba de interacción microbiana

Las pruebas de interacción microbiana se realizaron con los microorganismos escogidos tras realizar los bioensayos. Se seleccionaron aquellos microorganismos que presentaban un mejor crecimiento y se sembraron en medio líquido en cajas tri-Petri. Por cada microorganismo escogido se obtuvieron 4 cajas tri-Petri dando un total de 52 cajas utilizadas. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- 1) El primer paso consiste en preparar soluciones seriadas de las bacterias escogidas, hasta llegar a la disolución 10^{-4} .
- 2) Se prepararon 59 ml de medio de cultivo por cada bacteria y se aforo a 60 ml con 1 ml de disolución de 10^{-4} . Por cada bacteria se prepararon 4 cajas tri-Petri.

- 3) El agar vertido en las cajas se dejó solidificar. Preferentemente este proceso tiene que ser realizado en la mañana para agregar los discos de colonias bacterianas el mismo día en la tarde.
- 4) Es necesario tener los microorganismos aislados máximo de 18h a 24h.
- 5) Una vez solidificado el agar, se agregan discos de los microorganismos aislados con 18h-24h de anticipación (se obtienen con un saca bocados y una pequeña espátula previamente esterilizadas), y se colocan los discos boca abajo del lado donde se encuentra la colonia bacteriana.
- 6) Las cajas tri-Petri, tras ser debidamente inoculadas, rotuladas y agregados los discos, se dejan incubar por un período de 24h a 48h boca arriba y a temperatura ambiente, en una cámara de flujo laminar para obtener mejores resultados.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Cuento de microorganismos en U.F.C

Para el conteo de los microorganismos aislados se utilizó la siguiente ecuación.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{\# de colonias por placa} \times \text{el factor de dilución (inversa de la dilución)}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

Fuente: (Tortora, et al., 2007)

Tabla 1-3: Cuento de microorganismos en UFC del aislamiento primario.

#	Agar	Colonias	Concentración	UFC	Agar	Colonias	Concentración	UFC
1	A.N	58	10 ⁻⁴	580000	PDA	6	10 ⁻⁵	-
	GYM	190	10 ⁻⁴	1900000	A.N	43	10 ⁻⁵	4300000
2	A.N	10	10 ⁻⁴	-	PDA	20	10 ⁻⁵	-
	GYM	145	10 ⁻⁴	1450000	A.N	39	10 ⁻⁵	3900000
3	A.N	51	10 ⁻⁴	510000	PDA	4	10 ⁻⁵	-
	GYM	165	10 ⁻⁴	1650000	A.N	70	10 ⁻⁵	7000000
4	A.N	172	10 ⁻⁴	1720000	PDA	20	10 ⁻⁵	-
	GYM	216	10 ⁻⁴	2160000	A.N	73	10 ⁻⁵	7300000
5	A.N	19	10 ⁻⁴	-	PDA	1	10 ⁻⁵	-
	GYM	18	10 ⁻⁴	-	A.N	12	10 ⁻⁵	-
6	A.N	19	10 ⁻⁴	-	PDA	3	10 ⁻⁵	-
	GYM	39	10 ⁻⁴	390000	A.N	11	10 ⁻⁵	-
7	A.N	45	10 ⁻⁴	450000	PDA	5	10 ⁻⁵	-
	GYM	121	10 ⁻⁴	1210000	A.N	24	10 ⁻⁵	-
9	A.N	50	10 ⁻⁴	500000	PDA	8	10 ⁻⁵	-
	GYM	72	10 ⁻⁴	720000	A.N	0	10 ⁻⁵	-

Realizado por: (Edgar Uquillas, 2015)

Tras realizar este conteo fue escogida la concentración 10⁻⁴ (12cajas) por presentar un mejor crecimiento en casi todas las cajas Petri contadas por concentración (16 cajas) y la concentración 10⁻⁵ fue rechazada por presentar crecimiento contable en pocas cajas Petri (4 cajas). Tortora, et al (2007) propone que solamente las cajas Petri con 25 a 250 colonias son contabilizadas en UFC.

3.2. Análisis de laboratorio

3.2.1. Análisis físico químico del efluente de aguas residuales

Los análisis físico-químicos correspondientes a pesticidas organofosforados del efluente de aguas residuales del centro de acopio-Guaslán fueron realizados en el laboratorio Cessta (ESPOCH). Los siguientes parámetros fueron realizados *in situ*: TDS, C.E, pH y T°.

Tabla 2-3: Análisis físico químico del efluente de aguas residuales del centro de acopio-Guaslán.

Parámetro	Valor	Unidad	Fuente de verificación
E.C	0,397	mS	TULSMA Libro VI anexo 1
Pesticidas organofosforados	<0,2	Ppm	TULSMA Libro VI anexo 1
pH	8,17	-	TULSMA Libro VI anexo 1
T°	17,6	°C	TULSMA Libro VI anexo 1
TDS	280	Ppm	TULSMA Libro VI anexo 1
O.D	0,52	mg/L	TULSMA Libro VI anexo 1
DBO ₅	80	mg/L	TULSMA Libro VI anexo 1

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

Al analizar los resultados el único parámetro que esta fuera de norma son los pesticidas organofosforados. El resto de parámetros no presenta novedades. Los parámetros fueron comparados con el TULSMA, Libro VI, anexo 1, tabla 12. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce.

3.2.2. Análisis físico químico del afluyente liberado al medio

Los análisis físico-químicos correspondientes a pesticidas organofosforados del efluente liberado al medio por parte del centro de acopio-Guaslán fueron realizados en el laboratorio Cessta (ESPOCH). Los siguientes parámetros fueron realizados *in situ*: TDS, C.E, pH y T°.

Tabla 3-3: Análisis físico químico del efluente liberado al medio por parte del centro de acopio-Guaslán.

Parámetro	Valor	Unidad	Fuente de verificación
E.C	0,385	mS	TULSMA Libro VI anexo 1
Pesticidas organofosforados	0,04	mg/L	TULSMA Libro VI anexo 1
pH	7,84	-	TULSMA Libro VI anexo 1
T°	19	°C	TULSMA Libro VI anexo 1
TDS	273	Ppm	TULSMA Libro VI anexo 1

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

Los resultados expresados en la tabla 3-3 son todos permitidos por la Legislación Ecuatoriana vigente (TULSMA, libro VI, Anexo 1, tabla 12), evidenciando una disminución considerable en la concentración de pesticidas organofosforados.

3.2.3. Análisis físico químico de los lodos activos

El análisis físico-químico correspondiente a pesticidas organofosforados de los lodos activos del centro de acopio-Guaslán fueron realizados en el laboratorio CESSTA (ESPOCH). Los análisis físico-químicos restantes de los lodos activos del centro de acopio-Guaslán se llevaron a cabo en el laboratorio de suelos de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH, y fueron los siguientes: pH, % materia orgánica, textura, relación carbono/nitrógeno, humedad, carbono orgánico, nitrógeno, fósforo y potasio.

Tabla 4-3: Análisis físico químico de los lodos activos en el centro de acopio-Guaslán.

Parámetro	Valor	Unidad	Código
pH	7,1	-	Neutro
Pesticidas organofosforados	0,00072	mg/kg	En norma
% M.O	3,0	%	Medio
T°	19	°C	-
Textura	Franco arenoso	-	-
C/N	2,1	-	Bajo

Tabla 4-3: Continuación

Humedad	41,97	%	-
Carbono orgánico	1,74	%	-
Nitrógeno	3,1	mg/L	Bajo
Fósforo	21,3	mg/L	Medio
Potasio	0,49	Meq/100g	Bajo

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015).

Los resultados indican que el contenido de macronutrientes es bajo mientras que la relación carbono nitrógeno y el porcentaje de materia orgánica está en un rango medio, el contenido de pesticidas en el lodo es muy bajo por lo tanto podemos deducir que la biorremediación que ocurre en los lodos es gracias a los microorganismos presentes. Rodríguez (2003, p.2) señala que los pesticidas constituyen una adecuada fuente carbono y donadores de electrones para los microorganismos.

3.3. Caracterización primaria de los microorganismos aislados

3.3.1. Caracterización morfológica

Los microorganismos aislados en el laboratorio fueron divididos en diferentes grupos taxonómicos, según su caracterización morfológica, usando el código previamente asignado y mediante la observación de su forma, elevación, margen y color en la siguiente tabla:

Tabla 5-3: Caracterización morfológica de los microorganismos aislados.

Código	Color	Elevación	Forma	Margen
A.N 9 A	Rojo	Convexa	Circular	Entera
A.N 9 B	Amarillo	Convexa	Puntiforme	Entera
A.N 9 C	Amarillo	Elevada	Granular	Ondulada
A.N I A	Blanco	Elevada	Granular	Ondulada
A.N I B	Blanco	Plana	Convexa	Ondulada
A.N I C	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO
A.N II A	Blanco	Convexa	Granular	Entera
A.N II B	Tomate	Pulvinada	Circular	Entera
A.N II C	Blanco	Plana	Rizoide	Dentada
A.N III A	Blanco	Plana	Fusifforme	Lobulada
A.N III B	Blanco	Elevada	Puntiforme	Entera
A.N IV A	Amarilla	Convexa	Puntiforme	Entera
A.N IV B	Tomate	Elevada	Granular	Ondulada

Tabla 5-3: Continuación

A.N IV C	Amarilla	Convexa	Circular	Entera
A.N V A	Blanco	Plana	Rizoide	Dentada
A.N V B	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO
A.N V C	Blanco	Convexa	Puntiforme	Entera
A.N V D	Tomate	Convexa	Puntiforme	Entera
A.N V E	Tomate	Elevada	Granular	Entera
A.N VI A	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO
GYM 9 A	Blanco	Umbilicada	Granular	Arrissada
GYM 9 B	Blanco	Elevada	Granular	Entera
GYM 9 C	Blanco	Plana	Rizoide	Lobulada
GYM I A	Tomate	Plana	Fusifforme	Ondulada
GYM I B	Tomate	Convexa	Puntiforme	Entera
GYM I C	Blanca	Plana	Granular	Ondulada
GYM I D	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO
GYM II A	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO
GYM II B	Blanco	Plana	Granular	Ondulado
GYM II C	Amarilla	Convexa	Puntiforme	Entera
GYM II D	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO	ACTINOMICETO
GYM III A	Roja	Convexa	Puntiforme	Entera
GYM IV A	Rosada	Convexa	Puntiforme	Entera
GYM V A	Blanca	Plana	Rizoide	Filamentosa
GYM VII A	Tomate	Elevada	Circular	Ondulada
GYM VII B	Tomate	Plana	Granular	Lobulada
GYM VII C	Blanca	Plana	Puntiforme	Ondulada
GYM VII D	Tomate	Elevada	Granular	Lobulada
GYM VII E	Café	Convexa	Circular	Entera

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

Los resultados obtenidos se describen a continuación:

3.3.1.1. Color

El color predominante en los microorganismos aislados fue el color blanco, con un total de 15 microorganismos, seguido del color tomate con 9, amarillo 5, rojo 2, y rosado y café 1. Los valores se describen en la siguiente figura:

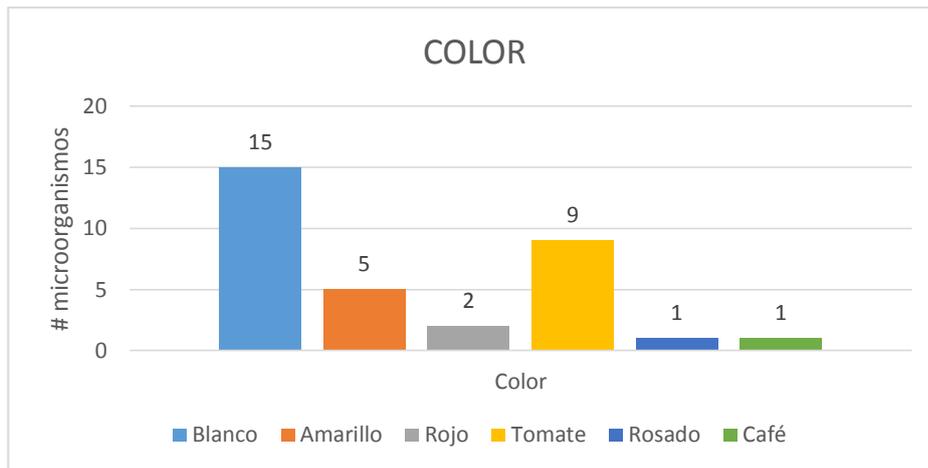


Figura 1-3: Número de microorganismos vs Color de los microorganismos aislados
Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015).

3.3.1.2. Elevación

El tipo de elevación más común en los microorganismos aislados durante esta investigación es la convexa con 12 microorganismos, seguida de la plana con 11, elevada 8, y pulvinada y umbilicada con 1 respectivamente. Los valores se describen en la siguiente figura:

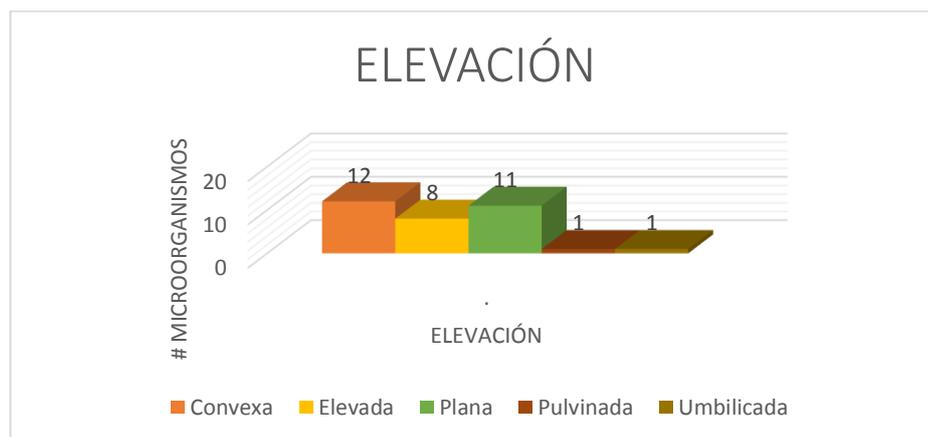


Figura 2-3: Elevación de los microorganismos aislados
Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

3.3.1.3. Forma

En cuanto a la forma predominante en los microorganismos aislados, domina la granular con 11 microorganismos, la sigue la puntiforme con 10, circular 6, rizoide 3 y fusiforme 2. Los valores se describen en la siguiente figura:

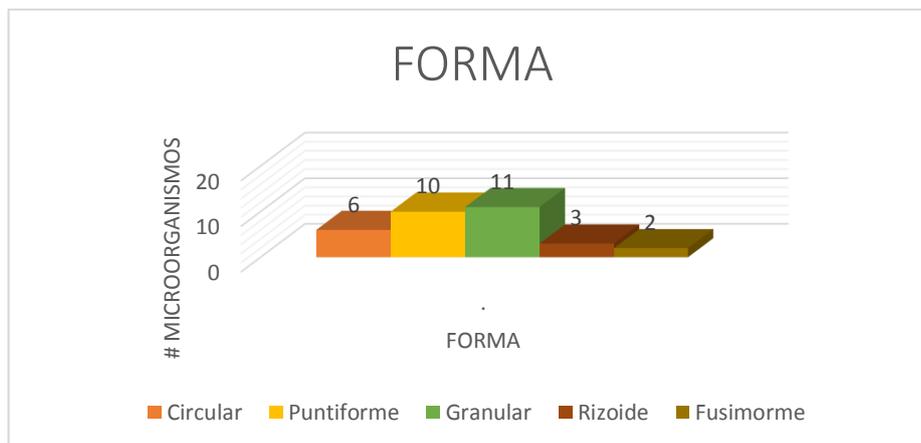


Figura 3-3: Número de microorganismos vs Forma de los microorganismos aislados

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

3.3.1.4. Margen

El margen predominante en los microorganismos aislados en esta investigación es entera con 16 microorganismos, le sigue el margen ondulado con 9, lobulado 4, dentado 2, y filamentoso y arrisada con 1 cada uno. Los valores se describen en la siguiente figura:

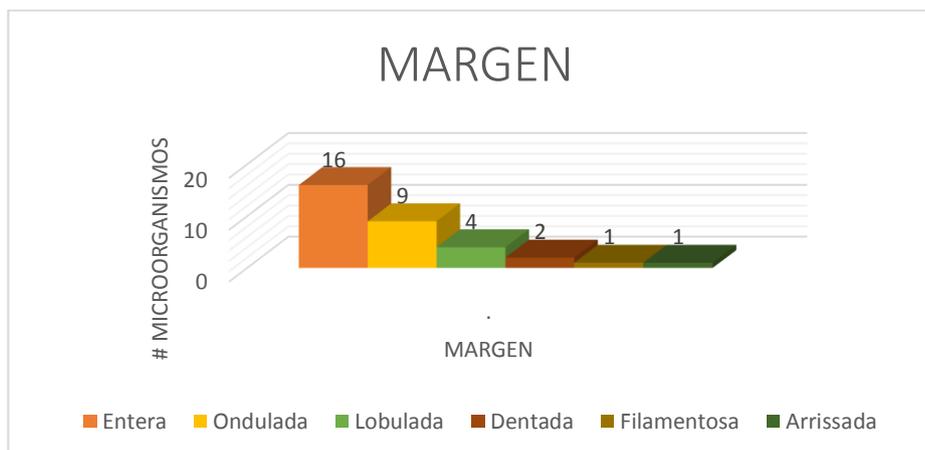


Figura 4-3: Número de microorganismos vs Margen de los microorganismos aislados

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

3.3.2. Tinción de Gram

De los 39 microorganismos aislados, 6 fueron actinomicetos, por lo que no se realizó tinción de Gram en ellos. De los restantes 33 microorganismos, 22 fueron Gram positivos y 11 Gram negativos. Los resultados se representan en la siguiente tabla:

Tabla 6-3: Tinción de Gram en los microorganismos aislados.

Código	Agar	Tinción	Código	Agar	Tinción
A.N 9 A	Nutritivo	Gram (+)	GYM 9 A	GYM	Gram (-)
A.N 9 B	Nutritivo	Gram (-)	GYM 9 B	GYM	Gram (-)
A.N 9 C	Nutritivo	Gram (+)	GYM 9 C	GYM	Gram (+)
A.N I A	Nutritivo	Gram (+)	GYM I A	GYM	Gram (+)
A.N I B	Nutritivo	Gram (+)	GYM I B	GYM	Gram (+)
A.N I C	Nutritivo	ACTINOMICETO	GYM I C	GYM	Gram (+)
A.N II A	Nutritivo	Gram (+)	GYM I D	GYM	ACTINOMICETO
A.N II B	Nutritivo	Gram (-)	GYM II A	GYM	ACTINOMICETO
A.N II C	Nutritivo	Gram (+)	GYM II B	GYM	Gram (-)
A.N III A	Nutritivo	Gram (+)	GYM II C	GYM	Gram (+)
A.N III B	Nutritivo	Gram (+)	GYM II D	GYM	ACTINOMICETO
A.N IV A	Nutritivo	Gram (+)	GYM III A	GYM	Gram (+)
A.N IV B	Nutritivo	Gram (+)	GYM IV A	GYM	Gram (+)
A.N IV C	Nutritivo	Gram (+)	GYM V A	GYM	Gram (+)
A.N V A	Nutritivo	Gram (-)	GYM VII A	GYM	Gram (+)
A.N V B	Nutritivo	ACTINOMICETO	GYM VII B	GYM	Gram (+)
A.N V C	Nutritivo	Gram (+)	GYM VII C	GYM	Gram (+)
A.N V D	Nutritivo	Gram (+)	GYM VII D	GYM	Gram (+)
A.N V E	Nutritivo	Gram (+)	GYM VII E	GYM	Gram (+)
A.N VI A	Nutritivo	ACTINOMICETO	-	-	-

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

3.3.3. Prueba de la oxidasa.

Se realizó la prueba de la oxidasa en los microorganismos seleccionados, después de hacer los bioensayos, constituyéndose en la primera prueba bioquímica para su clasificación. Los resultados se representan en la siguiente tabla:

Tabla 7-3: Prueba de la oxidasa en los microorganismos aislados.

Código	Agar	Oxidasa	Código	Agar	Oxidasa
A.N II C	Nutritivo	+	GYM I B	GYM	-
A.N IV B	Nutritivo	+	GYM II B	GYM	+
A.N IV C	Nutritivo	+	GYM III A	GYM	-
A.N V E	Nutritivo	+	GYM VII A	GYM	-
A.N 9B	Nutritivo	-	GYM VII C	GYM	+
A.N 9C	Nutritivo	+	GYM VII E	GYM	-
-----			GYM 9 A	GYM	+
			GYM 9B	GYM	+

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

Los resultados obtenidos nos indican que la mayoría de microorganismos obtenidos son oxidasa positivo con 9 microorganismos Vs. 5 microorganismos que son oxidasa negativo.

3.3.4. Prueba de la catalasa

Se realizó la prueba de la catalasa en los microorganismos seleccionados, después de realizar los bioensayos, constituyéndose en la segunda prueba bioquímica y el primer paso para la identificación bioquímica de los microorganismos aislados. Los resultados se representan en la siguiente tabla:

Tabla 8-3: Prueba de la catalasa en los microorganismos aislados.

Código	Agar	Catalasa	Código	Agar	Catalasa
A.N II C	Nutritivo	-	GYM I B	GYM	+
A.N IV B	Nutritivo	-	GYM II B	GYM	+
A.N IV C	Nutritivo	+	GYM III A	GYM	+
A.N V E	Nutritivo	-	GYM VII A	GYM	-
A.N 9B	Nutritivo	-	GYM VII C	GYM	-
A.N 9C	Nutritivo	-	GYM VII E	GYM	-

Tabla 8-3: Continuación

-----	GYM 9 A	GYM	+
	GYM 9B	GYM	+

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

La prueba de la catalasa concluye que existe mayor número de microorganismos catalasa negativo (8) que catalasa positivo (6).

3.4. Bioensayos con pesticidas organofosforados.

3.4.1. Selección de pesticidas aplicados en los bioensayos

Para la selección de los pesticidas a utilizarse en esta investigación, se tomó en cuenta en primer lugar que pertenecieran al grupo de los organofosforados. Bajo esta consideración se escogieron tres pesticidas que presentaban esta característica de los 9 pesticidas suministrados por el M.A.G.A.P. A continuación se detallan los pesticidas y las cantidades encontradas según al grupo químico al que pertenecen.

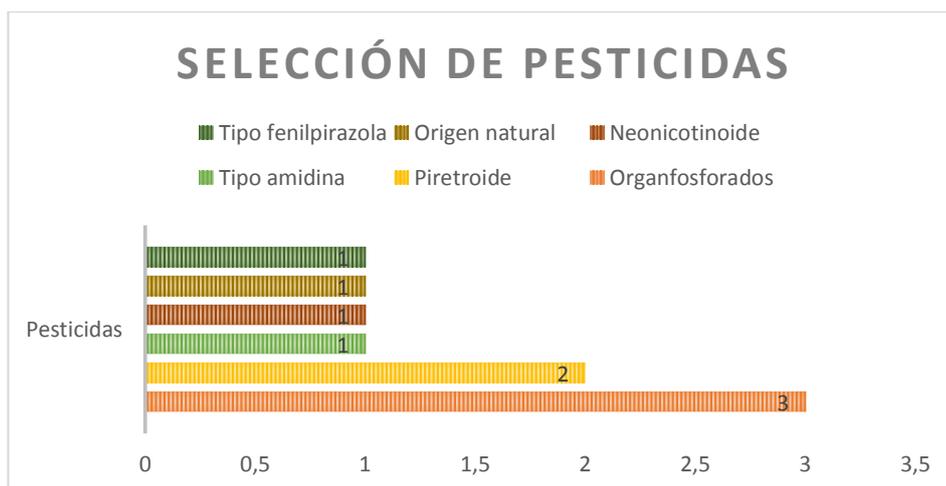


Figura 5-3: Selección de pesticidas usados para esta investigación

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

Los pesticidas que se encontraron en mayor número fueron los organofosforados (3), los pesticidas tipo piretroide (2) y finalmente los pesticidas de origen natural, tipo fenilpirazola y neonicotinoide (1) de cada uno.

3.4.2. Bioensayos aplicados a los microorganismos aislados

En los bioensayos aplicados a los microorganismos aislados fueron realizadas 4 repeticiones a diferentes concentraciones. Estas fueron de 0,1ppm, 0,5ppm, 1ppm y 2ppm. Los microorganismos que presentaron un mejor crecimiento a las diferentes concentraciones a las que fueron sometidos se describen en la siguiente tabla:

Tabla 9-3: Microorganismos que presentaron mejor crecimiento en los bioensayos.

Bioensayo 1					
Concentración	Código	Crecimiento	Concentración	Código	Crecimiento
0.1	A.N II C	+	0.1	GYM I B	+
0.1	A.N IV B	-	0.1	GYM II B	+
0.1	A.N IV C	+	0.1	GYM III A	+
0.1	A.N V E	+	0.1	GYM VII A	+
0.1	A.N 9 B	+	0.1	GYM VII C	+
0.1	A.N 9 C	+	0.1	GYM VII E	+
-----			0.1	GYM 9 A	+
			0.1	GYM 9 B	+
0.5	A.N II C	+	0.5	GYM I B	+
0.5	A.N IV B	+	0.5	GYM II B	+
0.5	A.N IV C	+	0.5	GYM III A	+
0.5	A.N V E	+	0.5	GYM VII A	+
0.5	A.N 9 B	+	0.5	GYM VII C	+
0.5	A.N 9 C	+	0.5	GYM VII E	+
-----			0.5	GYM 9 A	+
			0.5	GYM 9 B	+
1	A.N II C	+	1	GYM I B	+
1	A.N IV B	+	1	GYM II B	+

Tabla 9-3: Continuación

1	A.N IV C	+	1	GYM III A	+
1	A.N V E	+	1	GYM VII A	+
1	A.N 9 B	+	1	GYM VII C	+
1	A.N 9 C	+	1	GYM VII E	+
-----			1	GYM 9 A	+
			1	GYM 9 B	+
2	A.N II C	+	2	GYM I B	-
2	A.N IV B	+	2	GYM II B	+
2	A.N IV C	+	2	GYM III A	+
2	A.N V E	-	2	GYM VII A	+
2	A.N 9 B	+	2	GYM VII C	+
2	A.N 9 C	+	2	GYM VII E	+
-----			2	GYM 9 A	-
			2	GYM 9 B	+
Bioensayo 2					
Concentración	Código	Crecimiento	Concentración	Código	Crecimiento
0.1	A.N II C	+	0.1	GYM I B	+
0.1	A.N IV B	+	0.1	GYM II B	+
0.1	A.N IV C	+	0.1	GYM III A	+
0.1	A.N V E	+	0.1	GYM VII A	+
0.1	A.N 9 B	+	0.1	GYM VII C	+
0.1	A.N 9 C	+	0.1	GYM VII E	+
-----			0.1	GYM 9 A	+
			0.1	GYM 9 B	+
0.5	A.N II C	+	0.5	GYM I B	-

Tabla 9-3: Continuación

0.5	A.N IV B	+	0.5	GYM II B	+
0.5	A.N IV C	+	0.5	GYM III A	+
0.5	A.N V E	+	0.5	GYM VII A	+
0.5	A.N 9 B	+	0.5	GYM VII C	+
0.5	A.N 9 C	+	0.5	GYM VII E	+
-----			0.5	GYM 9 A	+
			0.5	GYM 9 B	+
1	A.N II C	+	1	GYM I B	+
1	A.N IV B	+	1	GYM II B	+
1	A.N IV C	+	1	GYM III A	+
1	A.N V E	+	1	GYM VII A	+
1	A.N 9 B	+	1	GYM VII C	+
1	A.N 9 C	+	1	GYM VII E	+
-----			1	GYM 9 A	-
			1	GYM 9 B	+
2	A.N II C	+	2	GYM I B	-
2	A.N IV B	+	2	GYM II B	+
2	A.N IV C	+	2	GYM III A	+
2	A.N V E	+	2	GYM VII A	+
2	A.N 9 B	+	2	GYM VII C	+
2	A.N 9 C	+	2	GYM VII E	+
-----			2	GYM 9 A	-
			2	GYM 9 B	+
Bioensayo 3					
Concentración	Código	Crecimiento	Concentración	Código	Crecimiento

Tabla 9-3: Continuación

0.1	A.N I I C	+	0.1	GYM I B	+
0.1	A.N I V B	+	0.1	GYM I I B	+
0.1	A.N I V C	+	0.1	GYM I I I A	+
0.1	A.N V E	+	0.1	GYM V I I A	+
0.1	A.N 9 B	+	0.1	GYM V I I C	+
0.1	A.N 9 C	+	0.1	GYM V I I E	+
-----			0.1	GYM 9 A	+
			0.1	GYM 9 B	+
0.5	A.N I I C	+	0.5	GYM I B	+
0.5	A.N I V B	+	0.5	GYM I I B	+
0.5	A.N I V C	+	0.5	GYM I I I A	+
0.5	A.N V E	+	0.5	GYM V I I A	+
0.5	A.N 9 B	+	0.5	GYM V I I C	+
0.5	A.N 9 C	+	0.5	GYM V I I E	+
-----			0.5	GYM 9 A	+
			0.5	GYM 9 B	+
1	A.N I I C	+	1	GYM I B	+
1	A.N I V B	+	1	GYM I I B	+
1	A.N I V C	+	1	GYM I I I A	+
1	A.N V E	+	1	GYM V I I A	+
1	A.N 9 B	+	1	GYM V I I C	+
1	A.N 9 C	+	1	GYM V I I E	+
-----			1	GYM 9 A	-
			1	GYM 9 B	+
2	A.N I I C	+	2	GYM I B	-

Tabla 9-3: Continuación

2	A.N IV B	+	2	GYM II B	+
2	A.N IV C	+	2	GYM III A	+
2	A.N V E	-	2	GYM VII A	+
2	A.N 9 B	+	2	GYM VII C	+
2	A.N 9 C	+	2	GYM VII E	+
-----			2	GYM 9 A	-
			2	GYM 9 B	+
Bioensayo 4					
Concentración	Código	Crecimiento	Concentración	Código	Crecimiento
0.1	A.N II C	+	0.1	GYM I B	+
0.1	A.N IV B	+	0.1	GYM II B	+
0.1	A.N IV C	+	0.1	GYM III A	+
0.1	A.N V E	+	0.1	GYM VII A	+
0.1	A.N 9 B	+	0.1	GYM VII C	+
0.1	A.N 9 C	+	0.1	GYM VII E	+
-----			0.1	GYM 9 A	+
			0.1	GYM 9 B	+
0.5	A.N II C	+	0.5	GYM I B	+
0.5	A.N IV B	+	0.5	GYM II B	+
0.5	A.N IV C	+	0.5	GYM III A	+
0.5	A.N V E	+	0.5	GYM VII A	+
0.5	A.N 9 B	+	0.5	GYM VII C	+
0.5	A.N 9 C	+	0.5	GYM VII E	+
-----			0.5	GYM 9 A	+
			0.5	GYM 9 B	+

Tabla 9-3: Continuación

1	A.N II C	+	1	GYM I B	+
1	A.N IV B	+	1	GYM II B	+
1	A.N IV C	+	1	GYM III A	+
1	A.N V E	+	1	GYM VII A	+
1	A.N 9 B	+	1	GYM VII C	+
1	A.N 9 C	+	1	GYM VII E	+
-----			1	GYM 9 A	-
			1	GYM 9 B	+
2	A.N II C	+	2	GYM I B	-
2	A.N IV B	+	2	GYM II B	+
2	A.N IV C	+	2	GYM III A	+
2	A.N V E	+	2	GYM VII A	+
2	A.N 9 B	-	2	GYM VII C	+
2	A.N 9 C	+	2	GYM VII E	+
-----			2	GYM 9 A	-
			2	GYM 9 B	+

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015).

Al finalizar los bioensayos se comprobó que la bacteria GYM IB no presentaba crecimiento a la concentración de 2 ppm y que la bacteria GYM 9A no presentaba crecimiento en las concentraciones de 1ppm y 2ppm por lo que la bacteria GYM 9A fue excluida de la prueba de interacción microbiana y de la identificación bioquímica.

3.4.3. Análisis estadístico y prueba de hipótesis

El análisis estadístico realizado con ANOVA de un factor tuvo dos hipótesis específicas, las cuales son detalladas a continuación:

Ho 1: El crecimiento Bacteriano depende de la concentración de organofosforados.

$$p < 0,005$$

Ha 1: El crecimiento Bacteriano no depende de la concentración de organofosforados.

$$p \geq 0,05$$

Tabla 10-3: Anova de un factor crecimiento bacteriano hipótesis 1.

	Suma de Cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,232	3	,411	,832	,478
Intra-grupos	108,607	220	,494		
Total	109,839	223			

Realizado por: (Edgar Uquillas, 2015)

En vista de que el valor $p=0,478$ es mucho que $0,05$ se acepta la hipótesis alternativa. Concluyendo que para este estudio las concentraciones de organofosforados con las cuales se trabajaron no ha tenido ninguna influencia en el crecimiento bacteriano.

Ho 2: El crecimiento Bacteriano depende del tipo de bacteria.

$$p < 0,005$$

Ha 2: El crecimiento Bacteriano no depende del tipo de bacteria.

$$p \geq 0,05$$

Tabla 11-3: Anova de un factor crecimiento bacteriano hipótesis 2.

	Suma de Cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7,464	13	,574	1,178	,297
Intra-grupos	102,375	210	,488		
Total	109,839	223			

Realizado por: (Edgar Uquillas, 2015)

En vista que el valor $p=0,297$ es superior a $p=0,05$ se selecciona la hipótesis alternativa.

Concluyendo que el tipo de bacterias no influyen en el crecimiento microbiano.

3.4.4. Prueba de interacción microbiana

En la prueba de interacción microbiana, la mayoría de las relaciones que se presentaron entre los microorganismos aislados fueron de neutralismo, solamente la bacteria A.N IV B presento una relación de antagonismo con las bacterias Gym II B y Gym 9 B por lo que no fue considerada para la identificación bioquímica.

Tabla 12-3: Microorganismos sometidos a la prueba de interacción microbiana.

Bacteria	Interacción	+/-	Bacteria	Interacción	+/-	Bacteria	Interacción	+/-
A.N IIC	IV B	+	A.N IVB	II C	+	A.N IVC	IIC	+
	IV C	+		IV C	+		IV B	+
	VE	+		VE	+		VE	+
	9 B	+		9B	+		9 B	+
	9 C	+		9C	+		9 C	+
	IB	+		IB	+		IB	+
	II B	+		IIB	+		II B	+
	III A	+		III A	+		III A	+
	VII A	+		VII A	+		VII A	+
	VII C	+		VII C	+		VII C	+
	VII E	+		VII E	+		VII E	+
9 B	+	9 B	+	9 B	+			
A.N VE	II C	+	A.N 9B	II C	+	A.N 9C	II C	+
	IV B	+		IV B	+		IV B	+
	IV C	+		IV C	+		IV C	+
	9 B	+		VE	+		VE	+
	9 C	+		9 C	+		9 C	+
	IB	+		IB	+		IB	+
	II B	+		II B	+		II B	+
	III A	+		III A	+		III A	+
	VII A	+		VII A	+		VII A	+
	VII C	+		VII C	+		VII C	+
	VII E	+		VII E	+		VII E	+
9 B	+	9 B	+	9 B	+			

Tabla 12-3: Continuación

GYM IB	II C	+	GYM IIB	II C	+	GYM IIIA	II C	+
	IV B	+		IV B	-		IV B	+
	IV C	+		IV C	+		IV C	+
	VE	+		VE	+		VE	+
	9 B	+		9 B	+		9 B	+
	9 C	+		9 C	+		9 C	+
	II B	+		IB	+		IB	+
	III A	+		III A	+		II B	+
	VII A	+		VII A	+		VII A	+
	VII C	+		VII C	+		VII C	+
	VII E	+		VII E	+		VII E	+
	9 B	+		9 B	+		9 B	+
GYM VII A	II C	+	GYM VII C	II C	+	GYM VII E	II C	+
	IV B	+		IV B	+		IV B	+
	IV C	+		IV C	+		IV C	+
	VE	+		VE	+		VE	+
	9 B	+		9 B	+		9 B	+
	9 C	+		9 C	+		9 C	+
	IB	+		IB	+		IB	+
	II B	+		II B	+		II B	+
	III A	+		III A	+		III A	+
	VII C	+		VII A	+		VII A	+
	VII E	+		VII E	+		VII C	+
	9 B	+		9 B	+		9 B	+
	II C	+						

GYM 9 B	IV B	-	
	IV C	+	
	V E	+	
	9 B	+	
	9 C	+	
	I B	+	
	II B	+	
	III A	+	
	VII A	+	
	VII C	+	
	VII E	+	

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015).

3.5. Identificación bioquímica de microorganismos aislados kit Microgen GN-ID

En la identificación bioquímica de los microorganismos aislados tras las pruebas de interacción microbiana se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 13-3: Identificación bioquímica de los microorganismos aislados.

Código	Identificación Bioquímica	Descripción
A.N II C	<i>K. pneumoniae</i>	Oxidasa negativo
A.N V E	<i>E. coli-inactive</i>	Oxidasa negativo
A.N 9B	<i>A. iwoffii</i>	Oxidasa negativo
A.N 9 C	<i>E. agglomerans complex</i>	Oxidasa negativo
GYM VII A	<i>X. maltophilia</i>	Oxidasa negativo
GYM VII C	<i>H. alvei biogp 1</i>	Oxidasa negativo
GYM VII E	<i>E. hormaechei</i>	Oxidasa negativo
A.N IV C	<i>Ps. Stutzeri</i>	Oxidasa positivo

Tabla 13-3: Continuación

GYM I B	<i>Ps. Fluorescens-35</i>	Oxidasa positivo
GYM II B	<i>Ps. Putida</i>	Oxidasa positivo
GYM III A	<i>Ps.fluorescens-35</i>	Oxidasa positivo
GYM 9 B	<i>Moraxella spp</i>	Oxidasa positivo

Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

Todas las bacterias fueron correctamente identificadas con la ayuda del software Microgen GN-ID.

3.6 Establecimiento del potencial protocolo de actuación

Este potencial protocolo de actuación es una herramienta-guía adaptado a procesos comunes realizados en la fosa séptica de un centro de acopio de frutas verduras y hortalizas del Ecuador, comprendido por una serie de actuaciones que conducen a materializar el resultado del proceso emprendido.

El posible protocolo de actuación es realizado por todas las personas que en el centro de acopio tienen responsabilidad de decisión y/o de ejecución en alguno de los pasos enumerados de este posible protocolo de actuación.

El posible protocolo de actuación permite disponer de orientaciones específicas para la biorremediación de pesticidas organofosforados. Revisa todas las posibles etapas, desde la construcción de las fosas sépticas hasta la eliminación de las aguas residuales al medio. Es una herramienta útil para realizar un proceso de seguimiento y evaluación continua en la biorremediación de pesticidas organofosforados pues proporciona las pautas de los aspectos que han de ser contemplados, recogidos y trabajados desde el inicio hasta su conclusión.

Actuaciones del protocolo:

1/ La fosa séptica debe poseer las siguiente dimensiones: 4 metros de largo, 2.5 metros de ancho y 1.20 metros de profundidad lo que nos da un volumen total de 12 metros cúbicos, mientras que la cama de lodo en el fondo de la fosa séptica debe poseer una profundidad promedio de 10 centímetros esparcida por toda la fosa séptica, esto nos da como resultado un volumen de lodo de 1 metro cúbico, estas dimensiones tiene que reproducirse en primera instancia.

2/ Es necesario construir una segunda fosa séptica con las mismas características a la fosa descrita en el punto anterior, ambas fosas estarán conectadas a la misma tubería de agua y se colocara

compuertas que impidan el paso de agua a una de las fosas mientras la otra funciona, esto con la finalidad de mantener siempre una fosa en funcionamiento mientras la otra recibe mantenimiento y de esta manera asegurarnos que las aguas residuales descargadas por el centro de acopio siempre cumplan con las normas técnicas establecidas.

3/ Los criterios técnicos para el correcto funcionamiento de la fosa séptica están basados en Ramalho.; et al (1990) y son los siguientes:

Tiempo de retención celular: 20-30 días

Concentración de sólidos en suspensión en el licor mezcla (SSLM): 3000-6000 mg/L

Tiempo de retención hidráulica: 18-36 horas

Carga másica Kg DBO₅/Kg SSLM d: 0.5-1.5

Carga volumétrica Kg DBO₅/m³ d: 0.16-0.40

4/ Los análisis físico-químicos realizados durante esta investigación sirven como base de comparación para el estado de las aguas y lodos de nuevos centros de acopio, estos análisis arrojaron los siguientes resultados:

- Efluente de aguas residuales en el centro de acopio-Guaslán

Conductividad Eléctrica (E.C)= 0,397 mS

pH= 8,17

Temperatura (T°)= 17,6°C

Sólidos disueltos totales (TDS)= 280ppm

Oxígeno disuelto (O:D)= 0,52 mg/L

DBO₅= 80 mg/L

- Afluente liberado al medio por parte del centro de acopio-Guaslán

Conductividad Eléctrica (E.C)= 0,385 mS

pH= 7,84

Temperatura (T°)= 19°C

Sólidos disueltos totales (TDS)= 273ppm

- Lodos activos del centro de acopio-Guaslán

pH= 7,1

Porcentaje de materia orgánica (%M.O)= 3,0

Temperatura (T°)= 19°C

Textura= Franco-arenoso

Relación carbono nitrógeno (C/N)= 2,1

Humedad= 41,97%

Carbono orgánico= 1,74%

Nitrógeno (N)= 3,1 mg/L

Fósforo (P)= 21,3 mg/L

Potasio (K)= 0,49 M_{eq}/100g

5/ El inóculo microbiano será extraído de la fosa séptica en funcionamiento en el centro de acopio-Guaslán, este inóculo debe ser igual a 1 kilogramo o corresponderá a las doce bacterias identificadas en esta investigación las cuales serán inoculadas directamente a los lodos nuevos en una concentración de 4000 mg/L y con 48 horas de anticipación antes de su uso, las bacterias a usarse en la preparación del inóculo son las siguientes: *Acinetobacter Iwoffii*, *Enterobacter agglomerans complex*, *Enterobacter hormaechei*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei biogp 1*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella spp*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Xanthomonas matophilia*.

6/ Es necesario brindar una adecuada disposición final a los lodos activos que sean extraídos de la fosa séptica del centro de acopio una vez que ha cumplido con su vida útil, dado que los lodos activos tienen presencia de patógenos se recomienda utilizar el método de incineración porque este método nos asegura una máxima reducción de volumen y la destrucción de patógenos y de compuestos tóxicos.

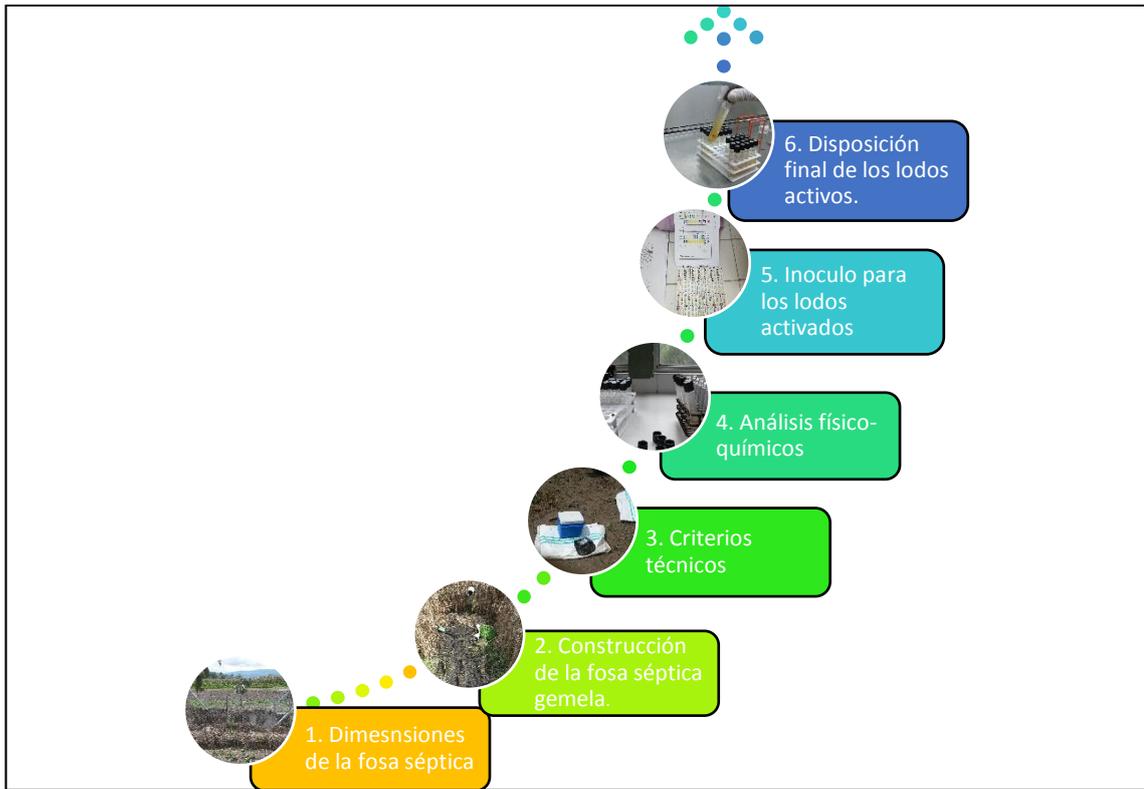


Figura 6-3: Diagrama funcional del posible protocolo de actuación.
 Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

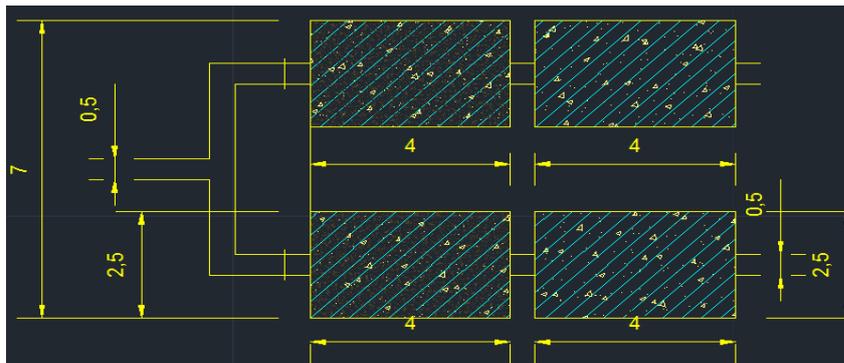


Figura 7-3: Esquema de construcción de las fosas sépticas
 Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

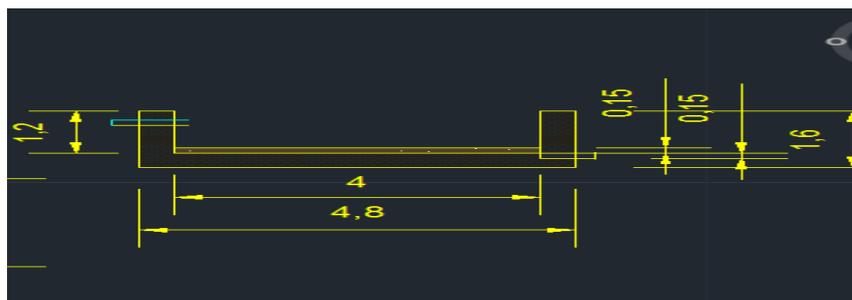


Figura 8-3: Esquema corte transversal y dimensiones fosa séptica
 Realizado Por: (Edgar Uquillas, 2015)

CONCLUSIONES

- Tras realizar los análisis físico-químicos del efluente de aguas residuales del centro de acopio del M.A.G.A.P, el efluente que es liberado al medio y los lodos activos donde estas son almacenadas antes de su descarga se concluye que el efluente de aguas residuales presenta valores normales en todos los parámetros analizados a excepción de los pesticidas organofosforados que excede el límite permisible establecido en la legislación ecuatoriana vigente, mientras que el afluente que es liberado al medio presenta valores muy por debajo del límite permisible. Además se ha podido observar que los lodos activos tienen una baja cantidad de nutrientes, hecho que evidencia que en el sitio existe una remediación natural de las aguas residuales causada por los microorganismos presentes en dichos lodos. Debido a la baja presencia de nutrientes, el hecho de que determinadas especies bacterianas se puedan desarrollar en estos fangos puede ser debido a que están usando los organofosforados (único elemento realmente presente) como fuente de carbono. Esta capacidad es la que les otorga a estos microorganismos la capacidad de eliminar a estos organofosforados del medio en el cual crecen.
- Una vez realizados los bioensayos a concentraciones de 0.1ppm, 0.5ppm, 1ppm, 2ppm y las interacciones microbianas con los microorganismos que presentaron mejor crecimiento en los bioensayos, en total se han podido aislar 13 especies microbianas que presentaban esta actividad biorremediadora, de las que se han mantenido para la elaboración de los lodos activos un total de 12 (eliminación de una colonia por su efecto antagonista con otras especies también aisladas). Estas doce bacterias fueron identificadas bioquímicamente como potenciales microorganismos capaces de degradar compuestos organofosforados y son las siguientes: *Acinetobacter Iwoffii*, *Enterobacter agglomerans complex*, *Enterobacter hormaechei*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei biogp 1*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella spp*, *Pseudomonas fluorescens (2)*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Xanthomonas matophilia*.
- Los criterios técnicos y metodológicos para el establecimiento del potencial protocolo de actuación en la biorremediación de pesticidas organofosforados son fundamentados en el diseño estructural para el dimensionamiento de la fosa séptica, volumen y distribución de lodos activos, cantidad y concentración de inóculo bacteriano, disposición final de los lodos activos.

RECOMENDACIONES

1. Una vez analizada la capacidad de determinadas bacterias para degradar compuestos organofosforados en aguas residuales, se recomienda analizar la capacidad degradadora de hongos y actinomicetos sobre compuestos organofosforados en suelos, y así poder ampliar el potencial arsenal de microorganismos capaces de biorremediar pesticidas, y poder brindar una correcta disposición final a los lodos activos presentes en el centro de acopio-Guaslán.
2. Al analizar los resultados obtenidos en los bioensayos, es necesario tener en cuenta que no todos los microorganismos presentan crecimiento en 24 horas, por lo que se recomienda analizar el crecimiento en los bioensayos a las 24 horas y 48 horas de incubación para descubrir posibles diferencias.
3. Se recomienda realizar más interacciones microbianas para determinar estadísticamente cuales son los microorganismos que presentan neutralismo, sinergismo y antagonismo de una forma más confiable y verificable.
4. Es necesario la construcción de una fosa séptica gemela aledaña a la existente en el centro de acopio-Guaslán, de esta manera siempre estará una en funcionamiento cuando se de mantenimiento a la otra y así se evitara que el agua residual descargada al ambiente presente niveles inadecuados de contaminantes como por ejemplo los organofosforados.
5. Finalmente se recomienda construir una planta piloto, para realizar pruebas en campo de los criterios técnicos descritos en el protocolo para lodos e inculo y comprobar la biorremediación evidencia en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

ALEMÁN, Zulia; et al. “Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?” [en línea]. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, vol. 43, no 3 (2005), (Cuba) pp. 1-4. [Consulta: 2015-10-20] ISSN: 0253-1751. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223214847006>

ANDRAMUÑO NÚÑEZ, Verónica. *Texto básico de biología celular y molecular I* Riobamba Ecuador: Facultad de Salud Pública, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 20008, pp. 27 - 35.

ARGUMEDO-DELIRA, Rosalba.; et al. “El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos”. *Revista internacional de contaminación ambiental*, vol. 25, no 4 (2009), (México) pp. 257-269.

ASSELBORN, Viviana.; et al. “Efectos del insecticida organofosforado clorpirifos sobre el crecimiento y morfología de *Selenastrum capricornutum* printz (Chlorophyta)”. *ESPÍNDOLA, ELG; PASCHOAL, CMR B.; ROCHA, O*, 2000, pp. 281-289.

BAIRD, Colin. *Química ambiental*. 2ª ed. Barcelona-España: Reverté, 2001, pp. 6-12

BOUAID, Abderrahim. *Nuevos métodos de tratamiento de muestra para la preconcentración, estabilización y determinación de pesticidas por cromatografía de gases*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2006, pp. 8-17

<http://biblioteca.ucm.es/tesis/qui/ucm-t25168.pdf>

[Consulta: 2015-10-19]

BRAVO, José. “Contaminantes emergentes en el agua” [en línea]. *Repositorio Universitario de la DGTIC*, vol. 10, no 8 (2009), (México) p.1. [Consulta: 2015-10-20] ISSN: 1607-6079. Disponible en:

<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num8/art54/int54.htm>

CABELLO-PAZ, Stefany. *Ensayos de biofilm (*pseudomona sp.* y *xanthomona sp.*) in vitro para la degradación de agentes tóxicos contenidos en plaguicidas como una alternativa para la*

biorremediación de aguas dulces. (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica del litoral, Guayaquil, Ecuador. 2010. pp. 7-11

<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/13678/1/informe%20final.pdf>

[Consulta: 2015-10-19]

CADENAS, Edwin. Introducción a la microbiología ambiental. *Informe técnico*. OPS/OMS-CEPIS. Lima, Perú, 1995, p. 7 -18.

CÁRDENAS, Oymada, et al. “Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001”. *Biomédica*, vol. 25, no 2 (2005), (Colombia) pp. 170-180.

CASTREJON, María Luisa.; SANCHEZ, Enrique.; ORTIZ, María Laura. Crecimiento de bacterias de suelos agrícolas sobre plaguicidas organofosforados como sustratos. *Facultad de Ciencias Biológicas. Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos*. Morelos. México. Informe interno, 2005, pp.1-5

CASTILLO, Gabriela. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. *Instituto Mexicano de Tecnología del agua*. México. 2004, pp. 99-110.

CORREDOR, Bibiana Betancur.; et al. “Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: caso DDT”. *Gestión y Ambiente*, vol. 16, no 3 (2013), (Colombia) pp. 119-135.

CZYSZZ, W., et al. Manual de disposición de aguas residuales. *Origen, descarga, tratamiento y análisis de las aguas residuales GTZ, EPIS, OPS y OMS*, Lima, Perú, 1991, p. 871-872.

DE ESPARZA, Castro, et al. “Evaluación de riesgos para la salud por el uso de aguas residuales en agricultura”. *Volumen I: Aspectos Microbiológicos. CIID, CEPIS-OPS*, 1990.

DÍAZ, Juan Carlos. “Revisión: Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera”. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, vol. 64, no 1 (2011), (Colombia) pp. 5867-5882.

FERRERA-CERRATO, Ronald.; et al. “Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos”. *Revista latinoamericana de Microbiología*, vol. 48, no 2 (2006), pp. 179-187.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE NATIONS (FAO). *International code of conduct on the distribution and use of pesticides*. Roma: FAO. 1986, p.28

FRIONI, Lilian. *Procesos Microbianos*. [en línea] Argentina. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, 1999 pp. 169-178 [Consulta: 10 de Noviembre de 2015]. ISBN: 950-665.109-4.169-178 Disponible en:

http://cadenahortofruticola.org/admin/tecno/35procesos_microbianos.pdf

GARCÍA-GÓMEZ, C.; GORTÁRES-MOROYOQUI, P.; DROGUI, P. “Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción” [en línea]. *Química Viva*, vol. 10, no 2 (2011), (Argentina) pp. 96-105. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 1666-7948. Disponible en:

<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v10n2/garcia.htm>

GIL, Miriam.; et al. “Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos” [en línea]. *Producción+ Limpia*, vol. 7, no 2 (2012), (Colombia) p. 52-73. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 1909-0455. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1909-04552012000200005&script=sci_abstract

QUERO-MAROTO, Héctor.; et al. *Comparativa de ampliación EDAR mediante reactor biológico convencional o MBR* [en línea] (tesis de pregrado). Universitat Politècnica de Catalunya BarcelonaTech, Barcelona-España, 2007. pp. 28-32 [Consulta: 2015-11-21] Disponible en:

<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/4432/Anejo%20B%20C%20Iculos.pdf?sequence=3>

LAGREGA, Michael.; et al. *Gestión de residuos tóxicos: tratamiento, eliminación y recuperación de suelos*. ed. Nueva York-Estados Unidos: McGraw-Hill, 1996, pp. 644-657

LONA-MARQUEZ, Héctor.; TISCAREÑO, Fernando. “La foto-oxidación en el tratamiento de aguas residuales”. *Ingeniería química*, no 358 (2000), pp. 22-27.

MADIGAN, Michael T., et al. *Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Madrid-España: Pearson Education/Prentice Hall, 2004, pp. 151-624.

MÉNDEZ, L.; et al. “Tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados a escala de laboratorio” [en línea], *Rev. Inst. investig. Fac. minas metal cienc. Geogr.* vol. 7, no 14 (2004), (Perú) pp. 74-83. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 1561-0888. Disponible en: http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S1561-08882004000200010&script=sci_arttext

MIRANDA, J. *Aislamiento, identificación y elaboración de un consorcio bacteriano para biorremediación de aguas y sedimentos contaminados provenientes del residual de las muestras*

ingresadas al *LAB-CESTTA*. (tesis de pregrado). Ingeniería en Biotecnología Ambiental. Escuela de Ciencias Químicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador, 2014 p.1

MURCIA, Alix Marcela.; STASHENKO, Elena. “Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia” [en línea]. *Agro sur*, vol. 36, no 2 (2008), (Colombia) p. 71-81. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 0304-8802. Disponible en:

http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S030488022008000200003&script=sci_arttext&tlng=es

NUVIA, L.; et al. “Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas” [en línea]. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, vol. 2, no 5 (2014), (México) p. 1-1. [Consulta: 2015-10-19]. ISSN 2007-2570. Disponible en:

<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.springer-4523f880-c794-3365-99ef-478e8e95c70e>

PLENGE-TELLECHEA, Fernando; et al. “Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas”. *Tecnociencia Chihuahua*, vol. 1, no 3 (2007), (México) pp. 4-6.

POLO, Alfredo; et al. “Contaminación y restauración de suelos”. *Centro de ciencias medioambientales* 2002, p. 109

PORTUGAL, V.; & GÓMEZ, Li. “Microorganismos y biodiversidad”. *Terra*, vol. 16, no 3 (2008), (México) pp. 1-3

RAMALHO, Rubens Sette.; et al. *Tratamiento de aguas residuales*. Barcelona-España: Reverté, 1990, p.10,260-366

RAMÍREZ, Guadalupe; et al. “Plaguicidas y salud de la población” [en línea]. *Ciencia Ergo Sum*, vol. 11, no 3 (2004), (México) p.249 [Consulta: 2015-10-20] ISSN 1405-0269. Disponible en:

<http://andoni.garritz.com/documentos/Lecturas.CS.%20Garritz/Contaminacion.Quimica/Plagidas.pdf>

RAMÍREZ, J. A.; LACASAÑA, M. “Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición”. *Arch Prev Riesgos Labor*, vol. 4, no 2 (2001), (México) pp. 67-75.

RAND, M. C., et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Prepared and published jointly by American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation.*, 1976.

RODRÍGUEZ, L. *Evaluación de dos sustratos en la técnica de landfarming para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos* (tesis de pregrado). Ingeniería en Biotecnología Ambiental. Escuela de Ciencias Químicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador, 2008. pp. 14-15

SÁNCHEZ-MARTÍN, Jesús.; RODRÍGUEZ-GALLEGO, José. “Biorremediación. Fundamentos y aspectos microbiológicos” [en línea]. *Industria y minería*, no 351 (2003), (España) pp. 12-16. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 11378042. Disponible en:

<http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=205890>

SEVERICHE, S.; et al. Manual de métodos analíticos para la determinación de parámetros fisicoquímicos básicos en aguas. *Fundación Universitaria Andaluz Inca Garcilaso*, 2013, p. 8

STAMATIU, K.; et al. “Tolerancia de hongos filamentosos a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones in vitro” [en línea]. *Revista internacional de contaminación ambiental*, vol. 31, no 1 (2015), pp. 23-37. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 0188-4999. Disponible en:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-49992015000100002&script=sci_arttext

STANIER, Roger.; et al. *Microbiología*. 2ª ed. Barcelona-España: Reverté, 1996, p. 80.

STARR, Cecie.; TAGGART, Ralph. “Biología la unidad y la diversidad de la vida”. *Innovación Educativa*, vol. 8, no 45 (2008), (México) pp. 56-58

TORRES-RODRÍGUEZ, Duilio. “El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos” [en línea]. *Revista Ecosistemas*, vol. 12, no 2 (2003), (Venezuela) p.2. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 1697-2473. Disponible en:

<http://revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/350>

TORTORA, Gerard.; et al. *Introducción a la Microbiología*. 9ª ed. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana, 2007. pp. 160-179

VALENCIA-OSPINA, Viviana.; et al. *Identificación de alternativas para la disposición final de los envases de plaguicidas de uso agrícola.* (Tesis Doctoral). Corporación Universitaria Lasallista, Caldas. Colombia. 2014. pp. 49-50

http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1092/1/Identificacion_alternativas_disposicion_final_envases_plaguicidas_agricola.pdf

[Consulta: 2015-10-20]

VARGAS-FLORES, Tatiana.; VILLAZANTE-CONDORI, L. “Clasificación de los Microorganismos” [en línea]. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, vol. 44 (2014), (Bolivia) p. 2309. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 2304-3768. Disponible en:

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000500002&script=sci_arttext&tlng=es

VILLEE, Claude; & ZARZA, Roberto. *Biología.* 7ª ed. Nueva York-Estados Unidos: McGraw-Hill, 1996, p. 1404

VITERI, F. *Estudio bioquímico clínico de la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos sobre el perfil hepático en agricultores de la parroquia de San Luis canton Riobamba provincia de Chimborazo* (tesis de pregrado). Bioquímica y Farmacia. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador, 2015. p.1.

ZAIDI, Baqar R.; MEHTA, Narinder K. “Effects of organic compounds on the degradation of p-nitrophenol in lake and industrial wastewater by inoculated bacteria” [en línea]. *Biodegradation*, vol. 6, no 4 (1995), (United States) pp. 275-281. [Consulta: 2015-10-20]. ISSN 1572-9729. Disponible en:

<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00695258>

ANEXOS

Anexo A. Sitio de Muestro



Fotografía N°1 Exterior fosa séptica del centro de acopio-Guaslán

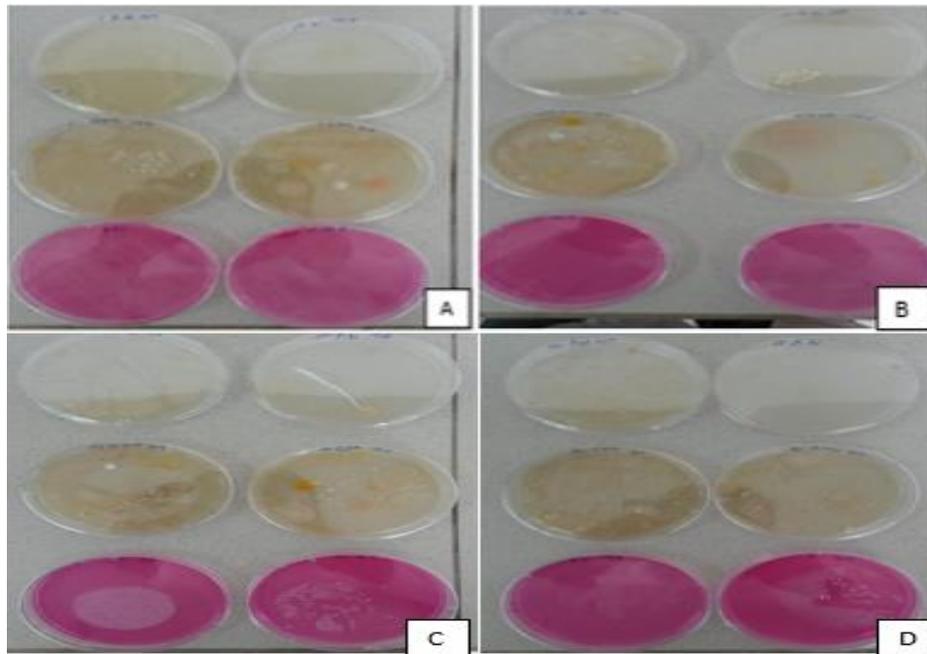


Fotografía N°2 Interior fosa séptica del centro de acopio-Guaslán

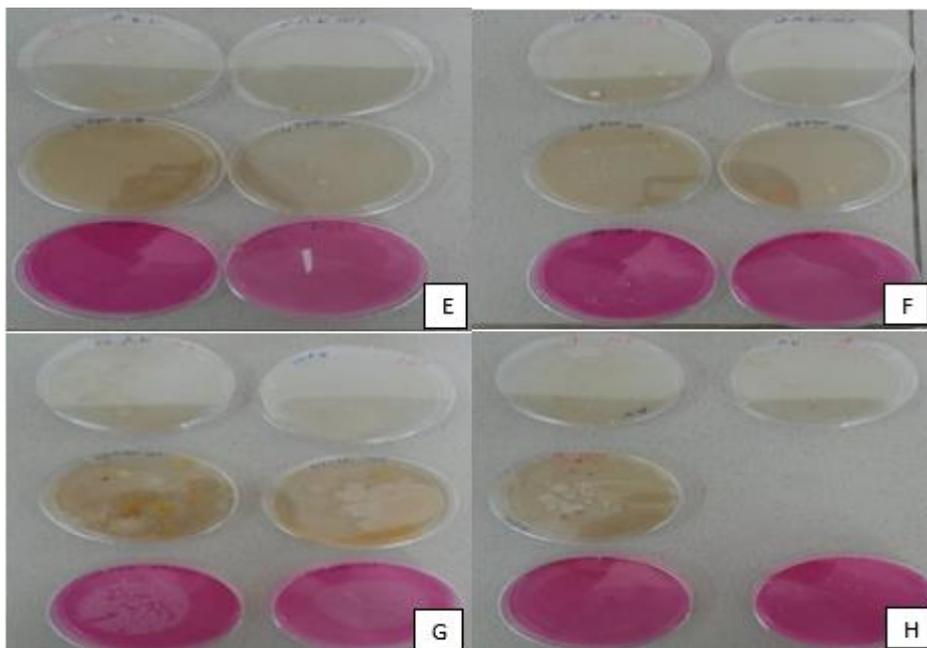


Fotografía N°3 Muestra compuesta de lodos activos de la fosa séptica

Anexo B. Crecimiento inicial de los microorganismos aislados de los lodos activos

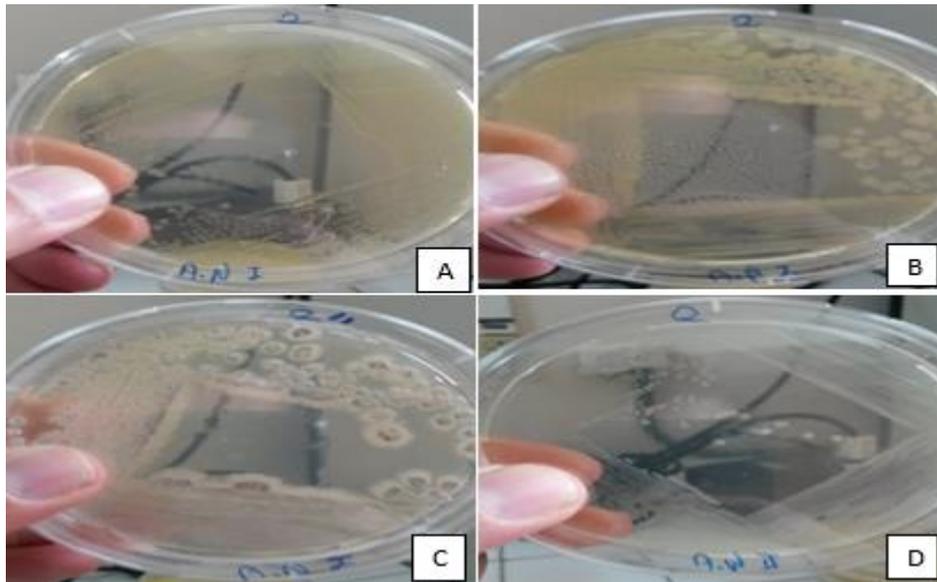


Fotografía N°4 Crecimiento inicial a las concentraciones 10^{-4} y 10^{-5} A) A.N 1 y GYM 1. B) A.N II y GYM II. C) A.N III y GYM III. D) A.N IV y GYM IV

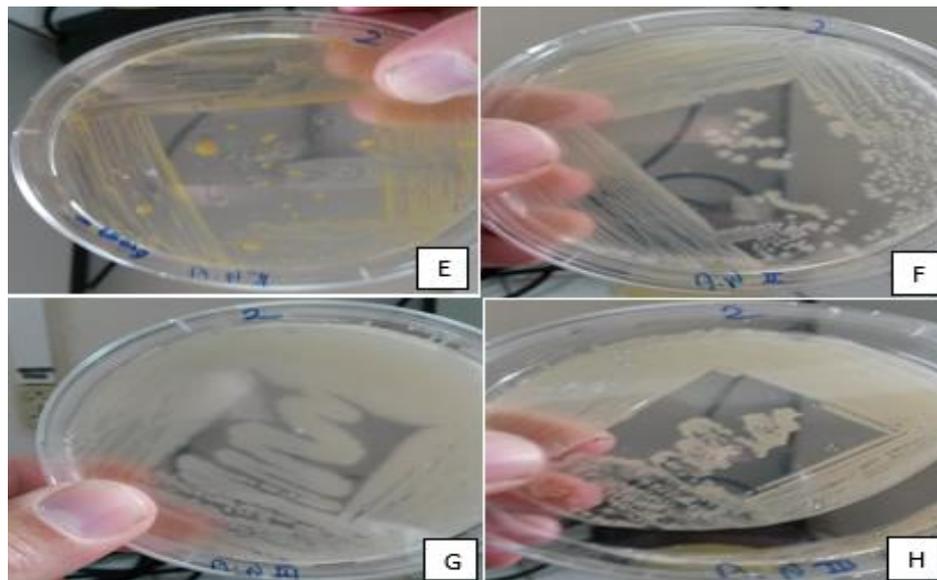


Fotografía N°5 Crecimiento inicial a las concentraciones 10^{-4} y 10^{-5} A) A.N V y GYM V. B) A.N VI y GYM VI. C) A.N VII y GYM VII. D) A.N 9 y GYM 9

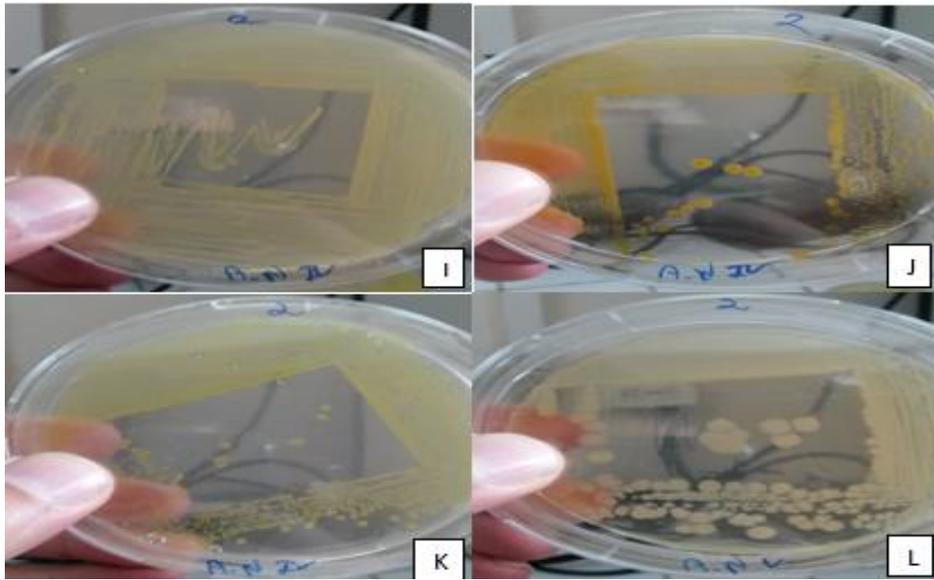
Anexo C. Bacterias Aisladas



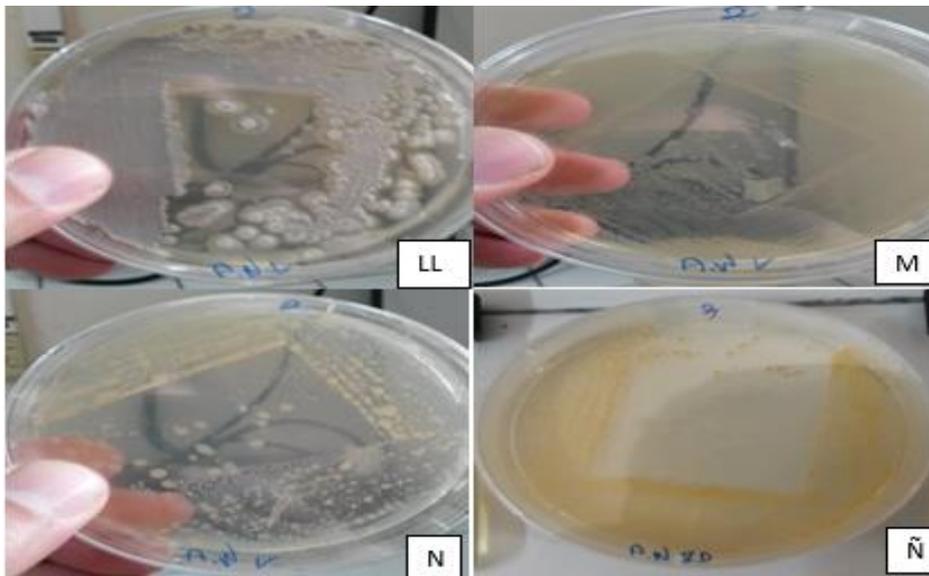
Fotografía N° 6 Bacterias aisladas A) A.N IA. B) A.N IB. C) A.N IC. D) A.N IIA



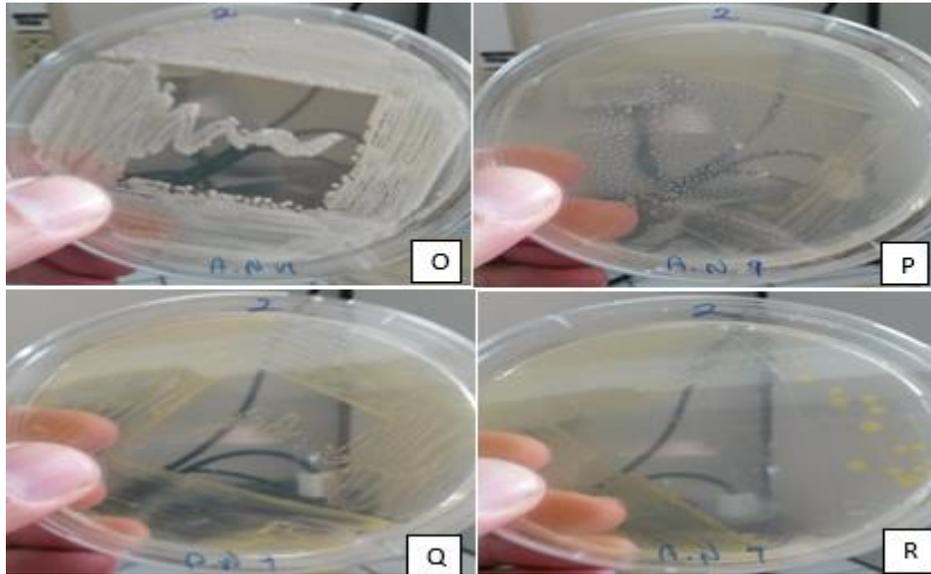
Fotografía N°7 Bacterias aisladas E) A.N IIB. F) A.N IIC. G) A.N IIIA. H) A.N IIIB



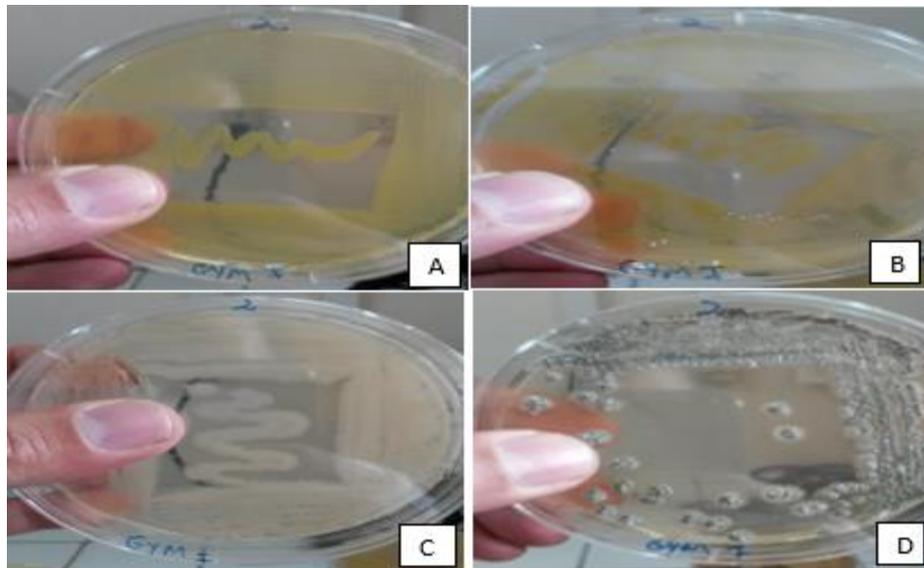
Fotografía N°8 Bacterias aisladas I) A.N IVA. J) A.N IVB. K) A.N IVC. L) A.N VA



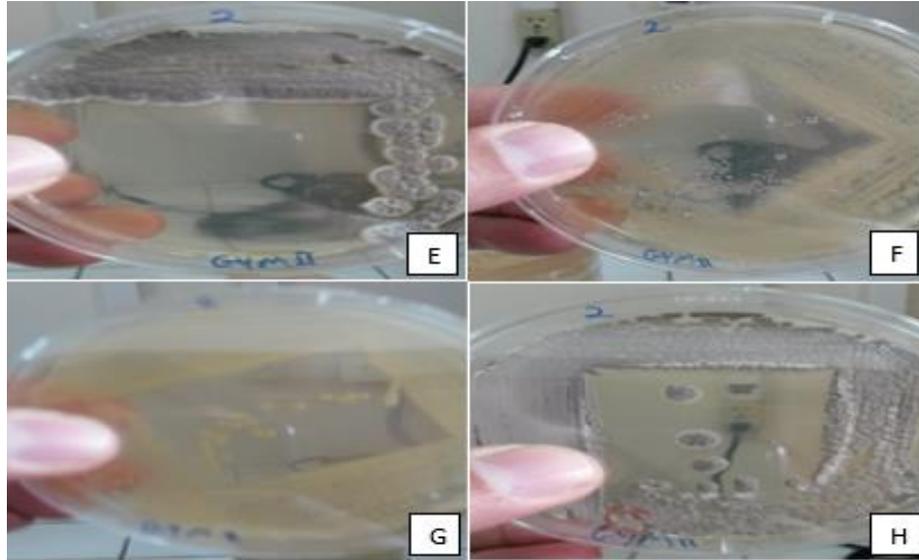
Fotografía N°9 Bacterias aisladas I) A.N VB. J) A.N VC. K) A.N VE. L) A.N VIA



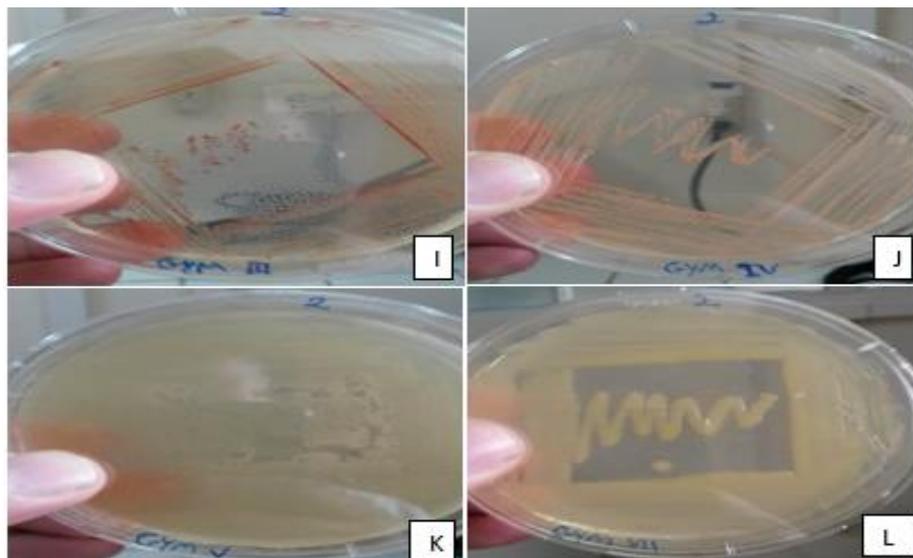
Fotografía N°10 Bacterias aisladas I) A.N VIA. J) A.N 9A. K) A.N 9B. L) A.N 9C



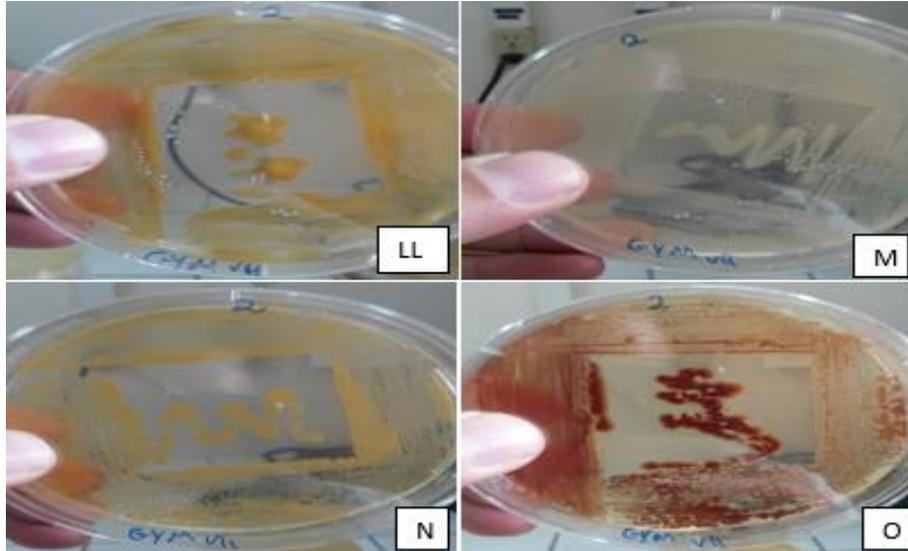
Fotografía N°11 Bacterias aisladas A) GYM IA. B) GYM IB. C) GYM IC. D) GYM ID



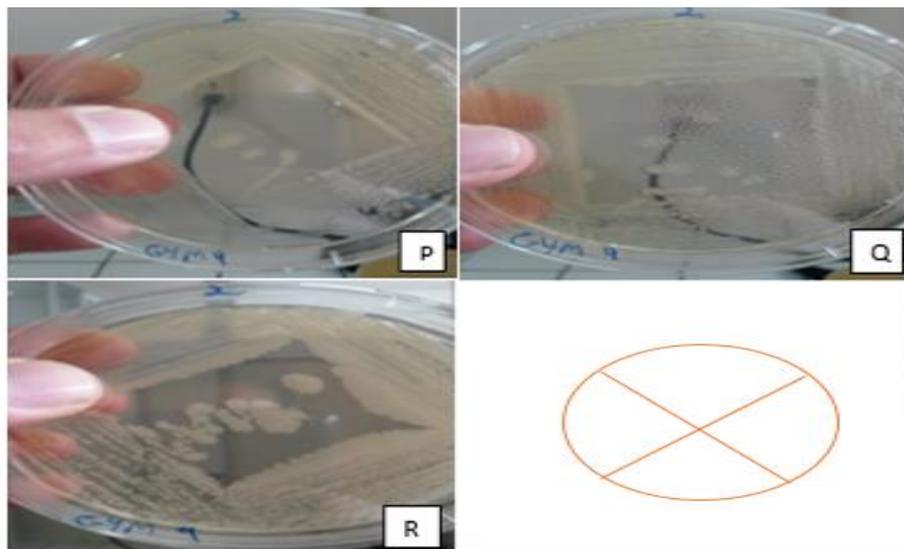
Fotografía N°12 Bacterias aisladas A) GYM IIA. B) GYM IIB. C) GYM IIC. D) GYM. IID



Fotografía N°13 Bacterias aisladas A) GYM IIIA. B) GYM IVA. C) GYM VA. D) GYM. VIID



Fotografía N°14 Bacterias aisladas A) GYM VIIB. B) GYM VIIC. C) GYM VIID. D) GYM. VIIE

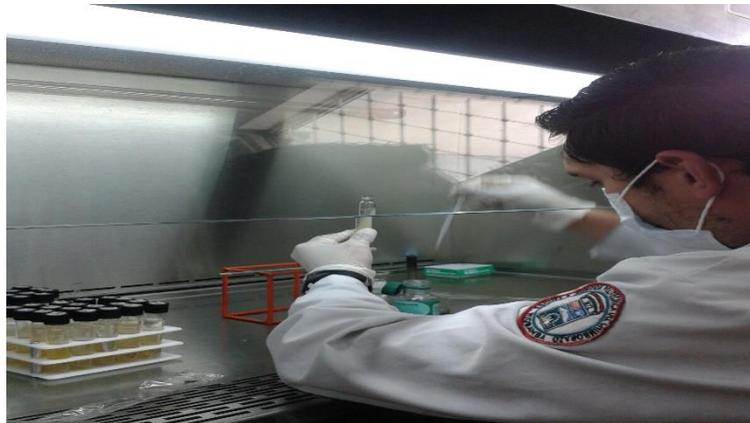


Fotografía N°15 Bacterias aisladas A) GYM 9A. B) GYM 9B. C) GYM 9C.

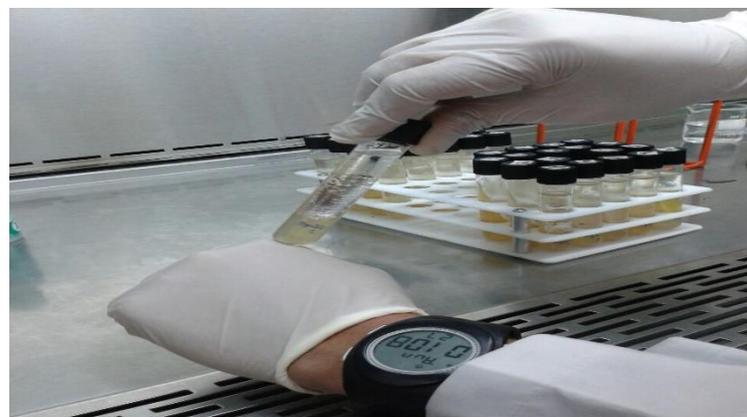
Anexo D. Conservación de los microorganismos aislados



Fotografía N°16 Preparación de medio cultivo



Fotografía N°17 Adición de Glicerina para la conservación de muestras



Fotografía N° 18 Muestra conservada en glicerina

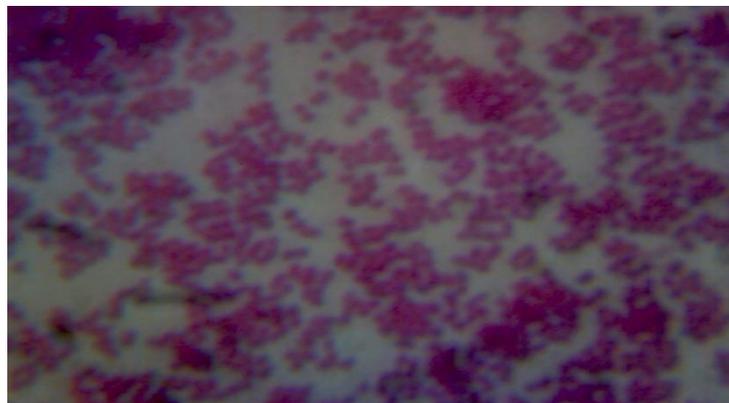
Anexo E. Tinción de Gram



Fotografía N° 19 Reactivos utilizados en la tinción de Gram



Fotografía N°20 Placas sometidas a la tinción de Gram

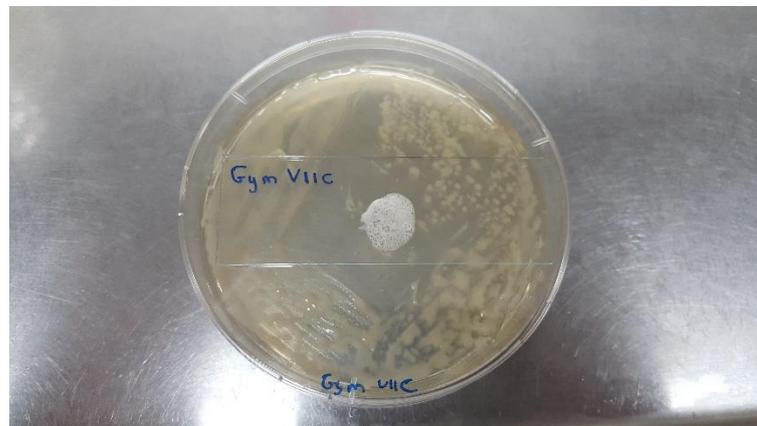


Fotografía N°21 Tinción de Gram observada al microscopio

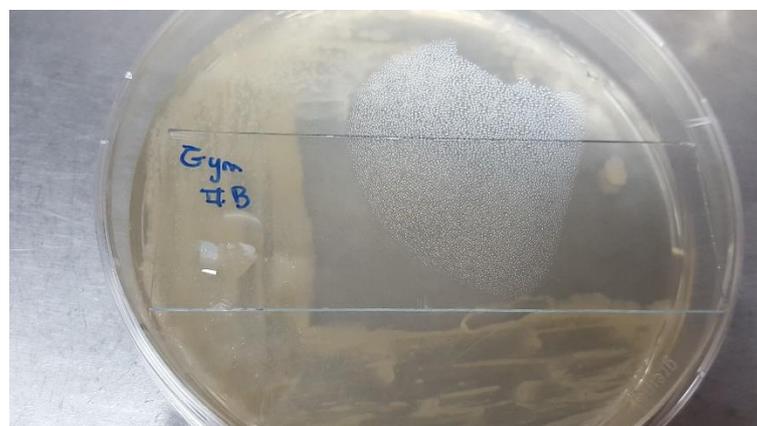
Anexo F. Prueba de la Catalasa



Fotografía N° 22 Prueba positiva bacteria Gym VII C

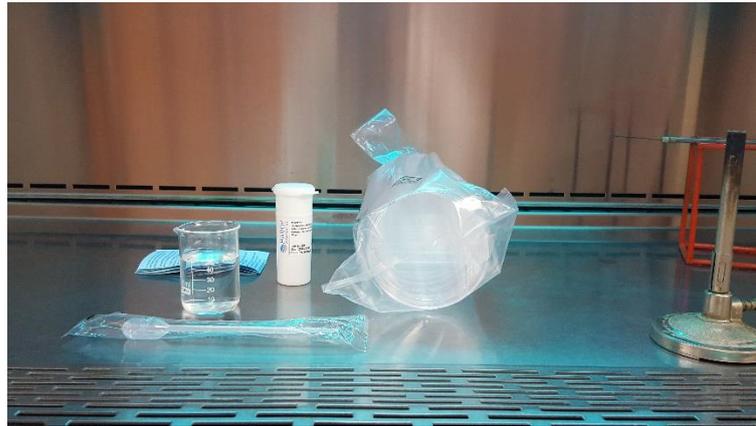


Fotografía N° 23 Reacción positiva prueba de la catalasa

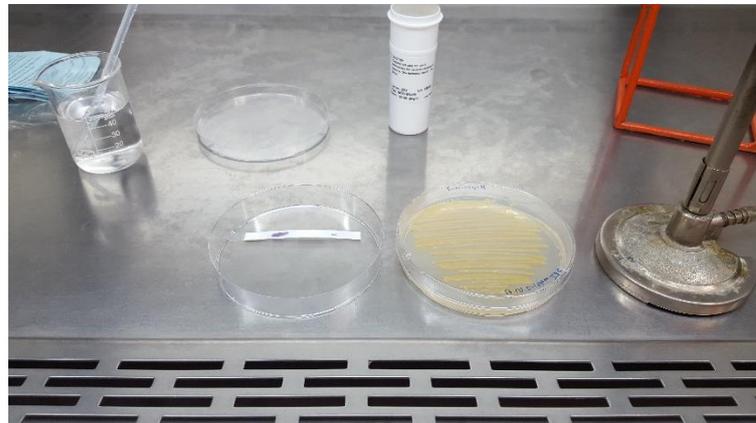


Fotografía N° 24 Prueba negativa bacteria Gym II B

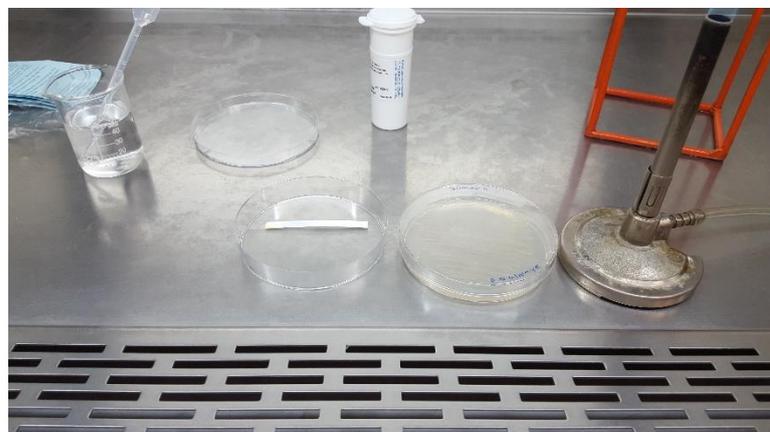
Anexo G. Prueba de la Oxidasa



Fotografía N° 25 Tiras Hardy para pruebas de oxidasa



Fotografía N° 26 Prueba positiva para la oxidasa

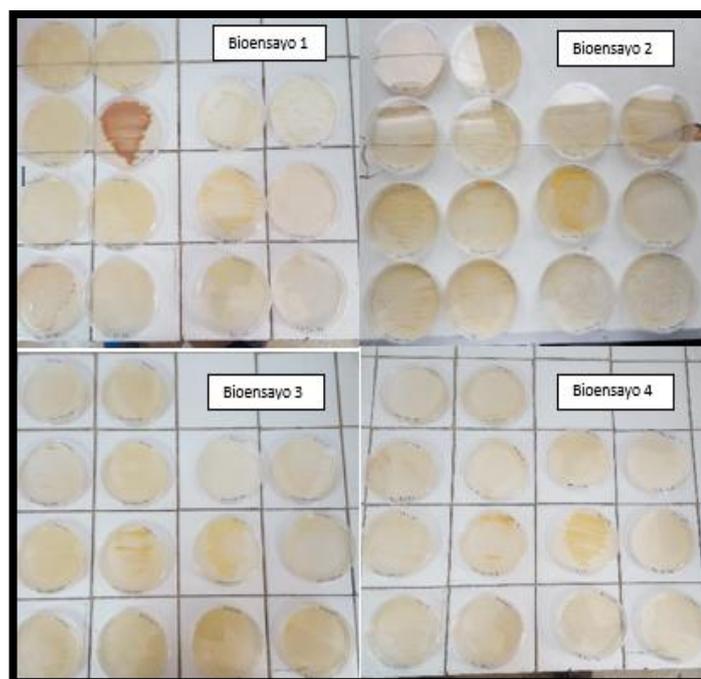


Fotografía N° 27 Prueba negativa para la oxidasa

Anexo H. Bioensayos



Fotografía N° 28 Preparación de los bioensayos a diferentes concentraciones



Fotografía N° 29 Ejemplo de los bioensayos 1, 2, 3 y 4

Anexo I. Interacciones microbianas



Fotografía N° 30 Preparación de las interacciones microbianas



Fotografía N° 31 Halo de inhibición sobre bacteria Gym 9 B



Fotografía N° 32 Halo de inhibición y halo de sinergismo en la bacteria II B

Anexo J. Identificación bioquímica con el kit Microgen GN-ID



Fotografía N° 33 Adición de reactivos kit Microgen GN-ID



Fotografía N ° 34 Lectura de los microposillos kit Microgen GN-ID



Fotografía N° 35 Identificación bioquímica de las bacterias aisladas

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.:
Name: IIC
Specimen Type:
Source (ward/location):

Date: 12/11/2015

Results Entry

Octal Code: 40563726

+ LYS	Lysine Decarboxylase	- ORN	Ornithine Decarboxylase	- H2S	H2S Production
- GLU	Acid from Glucose	- MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
+ ONP	ONPG	- IND	Indole	+ UR	Urea Hydrolysis
+ VP	Voges Proskauer	+ CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
- GEL	Gelatin Liquefaction	+ MAL	Malonate Utilization	+ INO	Acid from Inositol
+ SOR	Acid from Sorbitol	+ RHA	Acid from Rhamnose	+ SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	+ ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
+ RAF	Acid from Raffinose	+ SAL	Acid from Salicin	- ARG	Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.agglomerans complex</i>	<i>K.oxytoca</i>	<i>E.aerogenes</i>	<i>S.liquefaciens</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	100%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (99,9%)	LYS (0,1%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)
Test 2	MAN (99%)	GLU (99,9%)	XYL (99,9%)	MAN (99,9%)	MAN (99,9%)
Test 3	XYL (99%)	MAN (99,9%)	LAC (99,9%)	XYL (99,9%)	XYL (99,9%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Motility (37C)	0,1%	85%	0,1%	97%	95%
DNase (25C)	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	85%
Acetate Utilization	75%	30%	90%	50%	40%
Alpha Methyl D Gluc	90%	7%	98%	95%	5%
Methyl Red	10%	50%	20%	5%	93%

Additional Comments

47 Previously *Enterobacter liquefaciens*. Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225
Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Identification Comments

Acceptable Identification of *Klebsiella pneumoniae*
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.:
 Name: V E
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 12/11/2015

Results Entry

Octal Code: 43040430

- | | | |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| + LYS Lysine Decarboxylase | - ORN Ornithine Decarboxylase | - H2S H2S Production |
| - GLU Acid from Glucose | + MAN Acid from Mannitol | + XYL Acid from Xylose |
| - ONP ONPG | - IND Indole | - UR Urea Hydrolysis |
| + VP Voges Proskauer | - CIT Citrate Utilization | - TDA Tryptophan Deaminase |
| - GEL Gelatin Liquefaction | - MAL Malonate Utilization | - INO Acid from Inositol |
| + SOR Acid from Sorbitol | - RHA Acid from Rhamnose | - SUC Acid from Sucrose |
| - LAC Acid from Lactose | + ARA Acid from Arabinose | + ADO Acid from Adonitol |
| - RAF Acid from Raffinose | - SAL Acid from Salicin | - ARG Arginine Dihydrolase |

Identification Analysis

	<i>E.coli-inactive</i>	<i>K.ozanae</i>	<i>E.agglomerans complex</i>	<i>S.serotype Typhi</i>	<i>Y.pestis</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	87,44%	11,14%	0,67%	0,57%	0,08%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	LYS (0,1%)	GLU (99,9%)	LYS (0,1%)
Test 2	VP (0,1%)	VP (0,1%)	GLU (99,9%)	VP (0,1%)	GLU (99,9%)
Test 3	ADO (3%)	SAL (97%)	ADO (7%)	ADO (0,1%)	VP (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Motility (37C)	5%	0,1%	85%	97%	0,1%
Acid from Cellobiose	2%	92%	55%	0,1%	0,1%
Acid from Melibiose	40%	97%	50%	99,9%	20%
Tartrate (Jordans)	85%	50%	25%	99,9%	0,1%
Esculin Hydrolysis	5%	80%	60%	0,1%	50%
Additional Comments	21			46	

21 Previously the Alkalscens Dispar (ADO) Group
 46 Salmonella cannot be fully identified using biochemistry alone. Perform Polyvalent 'O' and 'H' slide agglutination to confirm, and serotype.
 #. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Identification Comments

Acceptable Identification of *Escherichia coli* - inactive
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
 Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.:
Name: 9 B
Specimen Type:
Source (ward/location):

Date: 12/11/2015

Results Entry

Octal Code: 4040001

+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
+ ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>A.lwoffii</i>	<i>A.haemolyticus</i>	<i>X.maltophilia</i>	<i>H.alvei biogp 1</i>	<i>E.ictaluri</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/46,574	1/48.110	1/769.437	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	49,29%	47,72%	2,98%	0,01%	<0,01%
Likelihood	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	ONP (0,1%)	ONP (0,1%)	ARG (1%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)
Test 2	ARG (6%)	ARG (6%)	CIT (98%)	ARG (0,1%)	ONP (0,1%)
Test 3			GEL (89%)		ARG (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Acid from Mannose	0%	0%	0%	99,9%	99,9%
Acid from Maltose	0%	0%	0%	0,1%	99,9%

Additional Comments 2 3 54 11

- 2 Glucose negative, non haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)
- 3 Glucose negative, haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)
- 11 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1981) 31 : 396-400
- 54 Previously Pseudomonas maltophilia. Also reported as Stenotrophomonas maltophila.
- #. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Identification Comments

Unacceptable Identification of Acinetobacter lwoffii
The strain is not typical (multiple tests are against), and it is poorly separated from other suggested identification choices
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.:
 Name: 9 C
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 12/11/2015

Results Entry

Octal Code: 03160400

- | | | |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| - LYS Lysine Decarboxylase | - ORN Ornithine Decarboxylase | - H2S H2S Production |
| - GLU Acid from Glucose | + MAN Acid from Mannitol | + XYL Acid from Xylose |
| - ONP ONPG | - IND Indole | + UR Urea Hydrolysis |
| + VP Voges Proskauer | + CIT Citrate Utilization | - TDA Tryptophan Deaminase |
| - GEL Gelatin Liquefaction | - MAL Malonate Utilization | - INO Acid from Inositol |
| + SOR Acid from Sorbitol | - RHA Acid from Rhamnose | - SUC Acid from Sucrose |
| - LAC Acid from Lactose | - ARA Acid from Arabinose | - ADO Acid from Adonitol |
| - RAF Acid from Raffinose | - SAL Acid from Salicin | - ARG Arginine Dihydrolase |

Identification Analysis

Select ID Choice	<i>E. agglomerans</i> complex	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>E. americana</i>	<i>E. coli</i> -inactive
Probability	Yes < 1/100,000,000	No < 1/100,000,000	No < 1/100,000,000	No < 1/100,000,000	No < 1/100,000,000
Percent Probability	79,22%	18,59%	1,42%	0,68%	0,05%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)
Test 2	ARA (95%)	VP (0,1%)	VP (0,1%)	UR (0,1%)	VP (0,1%)
Test 3	ONP (90%)	CIT (0,1%)	CIT (0,1%)	SOR (0,1%)	UR (1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Acid from Maltose	89%	0,1%	99,9%	16%	80%
Motility (37C)	85%	0,1%	5%	60%	5%
Acid from Arabitol	50%	0,1%	45%	99%	5%
Acid from Cellobiose	55%	0,1%	99,9%	10%	2%
Additional Comments		59	57	26	21
	21 Previously the Alkalscens Dispar (ADO) Group				
	26 Original citation: Ann. Microbiol. (1983) 134A : 39-52				
	57 Previously Yersinia enterocolitica sucrose negative. Curr. Microbiol. (1980) 4 : 219-244				
	59 Previously Yersinia enterocolitica-like group X2. Int. J. Syst. Microbiol. (1984) 34 : 166-172				
	#. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE				

Identification Comments

Unacceptable Identification of Enterobacter agglomerans complex
 The strain is not typical (multiple tests are against), and it is moderately well separated from other suggested identification choices
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
 Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref:
Name: VII A
Specimen Type:
Source (ward/location):

Date: 12/11/2015

Results Entry

Octal Code: 00402000

- | | | |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| - LYS Lysine Decarboxylase | - ORN Ornithine Decarboxylase | - H2S H2S Production |
| - GLU Acid from Glucose | - MAN Acid from Mannitol | - XYL Acid from Xylose |
| + ONP ONPG | - IND Indole | - UR Urea Hydrolysis |
| - VP Voges Proskauer | - CIT Citrate Utilization | - TDA Tryptophan Deaminase |
| - GEL Gelatin Liquefaction | + MAL Malonate Utilization | - INO Acid from Inositol |
| - SOR Acid from Sorbitol | - RHA Acid from Rhamnose | - SUC Acid from Sucrose |
| - LAC Acid from Lactose | - ARA Acid from Arabinose | - ADO Acid from Adonitol |
| - RAF Acid from Raffinose | - SAL Acid from Salicin | - ARG Arginine Dihydrolase |

Identification Analysis

	<i>X.maltophilia</i>	<i>A.lwoffii</i>	<i>A.haemolyticus</i>	<i>Enteric Gp60</i>	<i>X.nematophilis</i> (25°C)
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/28.562	1/1.979.897	1/2.045.168	1/21.721.006	1/42.466.306
Percent Probability	97,04%	1,4%	1,36%	0,13%	0,07%
Likelihood	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Human Isolate	No	Yes	Yes	No	No
Tests against					
Test 1	CIT (98%)	ONP (0,1%)	ONP (0,1%)	ORN (99,9%)	ONP (0,1%)
Test 2	LYS (94%)	MAL (0,1%)	MAL (0,1%)	GLU (99,9%)	MAL (0,1%)
Test 3	GEL (89%)				GLU (80%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Acid from Mannose	0%	0%	0%	99,9%	80%
Acid from Trehalose	0%	0%	0%	99,9%	0,1%

- Additional Comments**
- 54
- 2 Glucose negative, non haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)
- 3 Glucose negative, haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)
- 54 Previously Pseudomonas maltophilia. Also reported as Stenotrophomonas maltophila.
- #. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Identification Comments

Acceptable Identification of Xanthomonas (Stenotrophomonas) maltophilia
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.:
 Name: VII C
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 12/11/2015

Results Entry

Octal Code: 42040400

+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
+ VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	- INO Acid from Inositol
+ SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>H.alvei biogp 1</i>	<i>Y.ruckeri</i>	<i>S.serotype Typhi</i>	<i>S.marcescens biogp 1</i>	<i>A.lwoffii</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/27.698.454	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	72,66%	14,89%	9,78%	0,9%	0,68%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	No	Yes	No	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (99,9%)	ORN (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	MAN (0,1%)
Test 2	SOR (0,1%)	GLU (99,9%)	VP (0,1%)	SUC (99,9%)	VP (0,1%)
Test 3		VP (10%)	H2S (97%)	SAL (92%)	SOR (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Motility (37C)	0,1%	0,1%	97%	17%	0,1%
DNase (25C)	0,1%	0,1%	0,1%	82%	0%
Acid from Maltose	0,1%	95%	97%	70%	0%
Acid from Mannose	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	0%

Additional Comments

2 Glucose negative, non haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)

46 Salmonella cannot be fully identified using biochemistry alone. Perform Polyvalent 'O' and 'H' slide agglutination to confirm, and serotype

61 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1978) 28 : 37-44

#. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Identification Comments

Unacceptable Identification of Hafnia alvei biogp 1
 The strain is not typical (multiple tests are against), and it is moderately well separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
 Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.:
Name: VII E
Specimen Type:
Source (ward/location):

Date: 12/11/2015

Results Entry

Octal Code: 23462121

- | | | |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| - LYS Lysine Decarboxylase | + ORN Ornithine Decarboxylase | - H2S H2S Production |
| - GLU Acid from Glucose | + MAN Acid from Mannitol | + XYL Acid from Xylose |
| + ONP ONPG | - IND Indole | - UR Urea Hydrolysis |
| + VP Voges Proskauer | + CIT Citrate Utilization | - TDA Tryptophan Deaminase |
| - GEL Gelatin Liquefaction | + MAL Malonate Utilization | - INO Acid from Inositol |
| - SOR Acid from Sorbitol | - RHA Acid from Rhamnose | + SUC Acid from Sucrose |
| - LAC Acid from Lactose | + ARA Acid from Arabinose | - ADO Acid from Adonitol |
| - RAF Acid from Raffinose | - SAL Acid from Salicin | + ARG Arginine Dihydrolase |

Identification Analysis

	<i>E.hormaechei</i>	<i>C.davisae</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>E.taylorae (cancerogenus)</i>	<i>H.alvei</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/25,633,186	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	95,8%	3,27%	0,76%	0,16%	0,01%
Likelihood	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Human Isolate	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	LYS (99,9%)
Test 2	RHA (99,9%)	ARA (0,1%)	RAF (97%)	RHA (99,9%)	GLU (99,9%)
Test 3	UR (87%)	SAL (99%)	SOR (95%)	SUC (0,1%)	RHA (97%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Alpha Methyl D Gluc	83%	5%	85%	1%	0,1%
Acid from Cellobiose	99,9%	99,9%	99%	99,9%	15%
Acid from Dulcitol	87%	0,1%	15%	0,1%	0,1%
Acid from Arabitol	0,1%	99,9%	15%	0,1%	0,1%

Additional Comments

16 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1981) 31: 39-52

14 Original citation: J. Clin. Microbiol. (1984) 21 : 77-87

16 Previously Enteric Group 75. J. Clin. Microbiol. (1989) 27 : 2046-2049

#. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Identification Comments

Acceptable Identification of *Enterobacter hormaechei*
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: IB

Date: 15/11/2015

Name:

Specimen Type:

Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 64000001

+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	- NIT Nitrate Reduction
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
? VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Ps.putida</i>	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>A.faecalis type 11</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/31	1/195	1/715	1/31.307	1/829.849
Percent Probability	82,93%	13,34%	3,64%	0,08%	<0.01%
Likelihood	20,63%	3,67%	1,37%	0,03%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Tests against					
Test 1		CIT (95%)	ARG (14%)	ARG (0,1%)	CIT (95%)
Test 2			NIT (81%)		MAL (94%)
Test 3					NIT (85%)
Additional Tests					
Growth on Cetrimide	80%	89%	0,1%	12%	94%
Growth at 42C	0,1%	0,1%	69%	75%	99,9%
Oxidation of Glucose	99,9%	99,9%	99,9%	0,1%	99,9%

Additional Comments

2 Previously *A.faecalis*. Usually isolated from the environment

Identification Comments

Acceptable Identification of *Pseudomonas fluorescens* 37°C

The strain is not typical (one or more tests may be against), but is well separated from other suggested identification choices

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: II B

Date: 21/11/2015

Name:

Specimen Type:

Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 644000001

+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	- NIT Nitrate Reduction
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production
+ GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>Ps.putida</i>	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>Ps.fluorescens-25</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/650	1/3.927	1/31.387	1/332.827	1/2.236.393
Percent Probability	84,12%	13,93%	1,74%	0,16%	0,02%
Likelihood	1,16%	0,3%	0,02%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	CIT (95%)	ARG (14%)	GLU (0,1%)	CIT (95%)	CIT (99,9%)
Test 2	GLU (24%)	GLU (18%)		MAL (94%)	MAL (78%)
Test 3		NIT (81%)		NIT (85%)	
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth on Cetrimide	89%	0,1%	80%	94%	89%
Growth at 42C	0,1%	69%	0,1%	99,9%	0,1%

Additional Comments

Identification Comments

Acceptable Identification of *Pseudomonas putida*
 The strain is not typical (one or more tests may be against), although it is well separated from other suggested identification choices

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: III A

Date: 15/11/2015

Name:

Specimen Type:

Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 442100001

+ OXI Oxidase	- MOT Motility	- NIT Nitrate Reduction
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	- IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis
? VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>Moraxella spp.</i>	<i>Ps.putida</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/6.533	1/3.256.094	1/16.537.709	1/29.317.846	< 1/100,000,000
Percent Probability	99,73%	0,2%	0,04%	0,02%	<0.01%
Likelihood	0,1%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	MOT (94%)	MOT (99,9%)	CIT (95%)	MAN (0,1%)	MOT (99,9%)
Test 2	MAN (7%)	ARG (14%)	MAL (94%)	ARG (0,1%)	MAN (0,1%)
Test 3		MAN (18%)	MOT (93%)		CIT (95%)
Additional Tests					
Growth on Cetrinide	80%	0,1%	94%	0%	89%
Growth at 42C	0,1%	69%	99,9%	24%	0,1%
Growth in 6% NaCl	43%	80%	65%	8%	44%

Additional Comments

Identification Comments

Acceptable Identification of *Pseudomonas fluorescens* 37°C
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: IV C

Date: 15/11/2015

Name:

Specimen Type:

Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 740004001

+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
? VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
+ GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>A.xylooxidans</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/5.426	1/82.375	1/186.629	1/551.043	1/595.750
Percent Probability	89,4%	5,89%	2,6%	0,88%	0,81%
Likelihood	0,18%	0,01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GEL (3%)	CIT (95%)	ARG (0,1%)	ARG (0,1%)	GEL (0,1%)
Test 2	ARG (14%)	MAL (94%)	GEL (3%)		NIT (5%)
Test 3		GLU (85%)	CIT (80%)		
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Oxidation of Glucose	99,9%	99,9%	0,1%	0,1%	99,9%
Growth on Cetrimide	0,1%	94%	23%	0%	80%
Growth in 0% NaCl	96%	99,9%	99,9%	0,1%	99%
Growth at 42C	69%	99,9%	84%	27%	0,1%

Additional Comments

- 1 Previously *Alcaligenes xylooxidans*. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438

Identification Comments

Acceptable Identification of *Pseudomonas stutzeri*
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: 9 B

Date: 15/11/2015

Name:

Specimen Type:

Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 460010001

+ OXI Oxidase	- MOT Motility	- NIT Nitrate Reduction
+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
? VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>Moraxella</i> spp.	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>A.faecalis</i>	<i>Ps.putida</i>	<i>A.faecalis type 11</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/29,317,846	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	94,31%	5,63%	0,02%	0,01%	<0,01%
Likelihood	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	No
Tests against					
Test 1	TDA (0,1%)	ORN (0,1%)	CIT (99,9%)	MOT (99,9%)	ORN (0,1%)
Test 2	ARG (0,1%)	TDA (0,1%)	TDA (0,1%)	ORN (0,1%)	TDA (0,1%)
Test 3		MOT (94%)	ARG (0,1%)	TDA (0,1%)	ARG (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Oxidation of Glucose	0,1%	99,9%	0,1%	99,9%	0,1%
Growth on Cetrimide	0%	80%	92%	89%	12%
Growth on MacConkey	70%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%
Growth on SS Agar	0,1%	86%	99,9%	99,9%	78%
Growth in 0% NaCl	43%	99%	99,9%	99,9%	99,9%
Additional Comments			3		2
	2	Previously <i>A. faecalis</i> . Usually isolated from the environment			
	3	Previously <i>A. odorans</i> . Usually isolated from the environment			

Identification Comments

Acceptable Identification of *Moraxella* spp.
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

Anexo K. Análisis de laboratorio



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
 FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
 DEPARTAMENTO DE SUELOS



Nombre del Propietario: EDGAR UQUILLAS

Remite:

Fecha de ingreso: 01/03/2015
 Fecha de salida: 28/04/2015

Ubicación:

GUASLÁN
 Nombre de la granja

SAN LUIS
 Parroquia

RIOBAMBA
 Cantón

CHIMBORAZO
 Provincia

RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS QUÍMICO DE LODOS ACTIVOS

Identificación	pH	% M.O	Textura	Relación C/N	Humedad	% Carbono orgánico	mg/L NH4	P	K
58/LODOS ACTIVOS-POZOS SÉPTICOS	7.1 N	3.0 M	Franco arenoso	2.1 B	41.97	1.74	3.1 B	21.3 M	0.49 B

CODIGO	
N: Neutro	A: alto
S: Suficiente	M: medio
L.Ac. Lig. ácido	B: bajo

Ing. José Arcos T.
 DIRECTOR DPTO DE SUELOS
 Dirección: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Panamericana Sur Km1 1/2, Facultad de Recursos Naturales, Teléfono 2998220 Extensión 418

Ing. Elizabeth Pachacama
 TECNICO DE LABORATORIO

*Apoyando a la producción sana, rentable y amigable con la naturaleza

Fotografía N° 48 Resultados de físico-químicos de lodos



**CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y
TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA
AMBIENTAL**

**DEPARTAMENTO :
LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E
INSPECCIÓN (LABCESTTA)**

Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias)
RIOBAMBA - ECUADOR
Telefax: (03) 3013183

**LABORATORIO DE
ENSAYO
ACREDITADO POR
EL OAE**

**ACREDITACIÓN
Nº OAE LE 2C 06-008**

INFORME DE ENSAYO No: 926
ST: 334 – 15 ANÁLISIS DE AGUAS
Nombre Peticionario: N.A
Atn. Edgar Uquillas
Dirección: Primera Constituyente y Avda. Miguel A. León
Riobamba-Chimborazo

FECHA: 08 de Junio del 2015
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2015/05/28 – 12:00
FECHA DE MUESTREO: 2015/05/27 – 15:30
FECHA DE ANÁLISIS: 2015/05/28 – 2015/06/08
TIPO DE MUESTRA: Agua residual
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-A 610-15
CÓDIGO DE LA EMPRESA: NA
PUNTO DE MUESTREO: Fosa Séptica Guaslan
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico-Químico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Edgar Uquillas
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.:25,0 °C. T min.: 15,0 °C

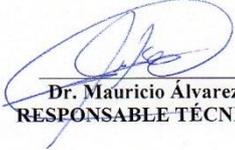
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
*Oxígeno disuelto	PEE/LABCESTTA/45 Standard Methods No. 4500 – O G	mg/L	0,52	-	-
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5días)	PEE/LABCESTTA/46 Standard Methods No. 5210 B	mg/L	80	±23%	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio
- Los parámetros marcados con (*) se encuentran fuera del alcance de acreditación del SAE.

RESPONSABLE:


Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH

 <p>CESTTA LABCESTTA SGC</p>	<p align="center">CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p align="center">LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN</p> <p align="center">Panamericana Sur Km. 1 ½ Telefax: (03) 3013183 ESPOCH (FACULTAD DE CIENCIAS) RIOBAMBA - ECUADOR</p>	<p align="center">LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL OAE</p> <p align="center">ACREDITACIÓN Nº OAE LE 2C 06-008</p>
--	---	--

INFORME DE ENSAYO No: 1473
ST: 14 – 590 ANÁLISIS DE AGUAS

Nombre Peticionario: DIRECCIÓN PROVINCIAL AGROPECUARIA DE CHIMBORAZO
Atn. Dirección: Ing. Víctor Angueta
Avda. 9 de Octubre, Junto a la Quinta Macají

FECHA: 26 de Agosto del 2014
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2014 / 08 / 14 – 16:30
FECHA DE MUESTREO: 2014 / 08 / 14 – 11:30
FECHA DE ANÁLISIS: 2014 / 08 / 14 – 2014 / 08 / 26
TIPO DE MUESTRA: Agua de vertiente
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-A – 1465-14
CÓDIGO DE LA EMPRESA: MAP1
PUNTO DE MUESTREO: Punto de captación para agua de consumo de la planta en el centro de acopio.
ANÁLISIS SOLICITADO: Coliformes Totales
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Edgar Uquillas
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.:25.0 °C. T min.: 15.0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
*Organoclorados Totales	PEE/LABCESTTA/130 Standard Methods No. 6630 D/GC-MS	µg/L	< 0,04	-	-
*Organofosforados Totales	PEE/LAB CESTTA/131 Standard Methods No. 6630 D/GC-MS	µg/L	< 0,2	-	-
Coliformes Totales	PEE/LABCESTTA/47 Standard Methods No. 9222 B	UFC/100 ml	560	-	±20%

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE

RESPONSABLE:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

**LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPOCH**

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados
MC01-14

Página 1 de 1
Edición 3

Fotografía N° 50 Resultado del análisis de pesticidas en las aguas del efluente de aguas residuales del centro de acopio-Guaslán



**CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y
TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL**
DEPARTAMENTO :
**LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN
(LABCESTTA)**

Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias)
RIOBAMBA - ECUADOR
Telefax: (03) 3013183

INFORME DE ENSAYO No: 1506
ST: 532 – 15 ANÁLISIS DE AGUAS
Nombre Peticionario: NA
Atn. Edgar Alexis Uquillas Munizaga
Dirección: Primera Constituyente y Miguel Ángel León
Riobamba-Chimborazo

FECHA: 19 de Octubre del 2015
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2015/10/07 – 16:20
FECHA DE MUESTREO: 2015/10/07 – 12:30
FECHA DE ANÁLISIS: 2015/10/07 – 2015/10/19
TIPO DE MUESTRA: Agua Residual
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-A 1126-15
CÓDIGO DE LA EMPRESA: AGFQ1
PUNTO DE MUESTREO: Fosa séptica Guaslan
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico-Químico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Edgar Uquillas
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.:25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Organofosforados Totales	PEE/LABCESTTA/131 GC	µg/L	0,04	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH



**CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y
TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA
AMBIENTAL**

**LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E
INSPECCIÓN**

Panamericana Sur Km. 1 ½
Telefax: (03) 3013183
ESPOCH (FACULTAD DE CIENCIAS)
RIOBAMBA - ECUADOR

INFORME DE ENSAYO No:
ST:

1446
14- 101 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario:

DIRECCIÓN PROVINCIAL AGROPECUARIA DE
CHIMBORAZO

Atn.

Ing. Víctor Angueta

Dirección:

Av. 9 de Octubre, junto a la Quinta Macají

FECHA:

26 de Agosto del 2014

NUMERO DE MUESTRAS:

1

FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:

2014/08/15 10:30

FECHA DE MUESTREO:

2014/08/14 16:00

FECHA DE ANÁLISIS:

2014/08/15 - 2014/08/26

TIPO DE MUESTRA:

Suelo agrícola

CÓDIGO LABCESTTA:

LAB-S 314-14

CÓDIGO DE LA EMPRESA:

MSG1

PUNTO DE MUESTREO:

Punto de descarga fosa séptica

ANÁLISIS SOLICITADO:

Físico- Químico

PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:

Edgar Uquillas

CONDICIONES AMBIENTALES:

T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Organoclorados Totales	PEE/LABCESTTA/133 GC-MS	mg/kg	0,0028	-	-
Organofosforados Totales	PEE/LABCESTTA/134 GC-MS	mg/kg	0,00072	-	-
Carbamatos	PEE/LABCESTTA/ GC-MS	mg/kg	0,00076	-	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO
LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.

Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados.

MC01-16

Página 1 de 1

Edición 2

Fotografía N° 52 Resultado del análisis de pesticidas de los lodos activos