

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE UN INSECTICIDA
ORGANOFOSFORADO EN MUESTRAS DE SUELO DE CULTIVO DE PAPA
MEDIANTE *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.**

AUTORA

LUCÍA FERNANDA MALDONADO TORO

TUTORA

LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Quito, Marzo de 2017

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Lucía Fernanda Maldonado Toro, con documento de identificación No. 1727326322, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa mediante *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana



Nombre: Lucía Maldonado Toro

Cédula: 1727326322

Fecha: 02.03.2017

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DE LA DOCENTE TUTORA

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Evaluación de la biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa mediante *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*”, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo, 12017



Laura Elizabeth Huachi Espín

Cédula de Identidad

1711113744

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mi mamá, a mi abuelita, a mi tía por todo el cariño, la entrega, el amor y el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo así como durante toda mi formación académica. Las amo infinitamente!

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, al Universo en el creó firmemente, al Biólogo Luis Baquero Rivadeneira, Curador de Orquídeas del Jardín Botánico de Quito; al Ing. Marco Ibarra trabajador de los laboratorios del CIVABI; al Ing. Janss Beltrán, docente de la UPS, al Ing. Diego Toro Zurita, mi primo; a mi amiga Michelle Paredes Sandoval y a mi papá, por todo el apoyo y la colaboración brindada durante el desarrollo y culminación de este trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	9
MARCO TEÓRICO	9
1.1 Plaguicidas.....	9
1.1.1 Clasificación de los plaguicidas.....	9
1.1 Insecticidas Organofosforados	10
1.1.1 Estructura química y clasificación	10
1.1.2 Propiedades de los organofosforados.....	11
1.1.3 Usos de los organofosforados	12
1.1.4 Toxicidad de los IOP.....	12
1.1.5 Mecanismos de acción de los IOP	13
1.1.6 Dosis de IOP más usados	13
1.1.7 Condiciones de degradación de los IOP.....	14
1.1.8 Efectos.....	15
1.2 Clorpirifos	17
1.2.1 Proceso de degradación de la molécula Clorpirifos.....	18
1.2.2 Condiciones de degradación de Clorpirifos	18
1.3 Biorremediación	19

1.3.1	Tipos de biorremediación.....	20
1.3.2	Micorremediación	21
CAPÍTULO 2.....		30
MARCO METODOLÓGICO		30
2.1	Ubicación de sitios de recolección	30
2.2	Fase de campo	31
2.2.1	Muestreo: Técnica del Tresbolillo	31
2.2.2	Georeferenciación.....	31
2.2.3	Transporte y almacenamiento.....	31
2.2.4	Csiro Piri Software.....	31
2.2.5	Construcción del terrario climatizado.....	32
2.2.6	Inoculación del insecticida en suelo	33
2.2.7	Diseño experimental	33
2.2.8	Implementación del ensayo	34
2.2.9	Variables en estudio.....	34
2.3	Fase de laboratorio	35
2.3.1	Análisis físico-químico del suelo.....	35
2.3.2	Análisis por Cromatografía de Gases aplicado a masas (GC/MS).....	36
2.3.3	Preparación de medios de cultivo	37
2.3.4	Diluciones seriadas	38

2.3.5 Siembras en Placa Pobre de <i>Trichoderma harzianum</i>	38
2.3.6 Identificación macroscópica de <i>Trichoderma harzianum</i>	38
2.3.7 Microcultivo de <i>Trichoderma harzianum</i>	38
2.3.8 Identificación microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i>	39
2.3.9 Conservación <i>Trichoderma harzianum</i>	39
2.3.10 Crioconservación de <i>Trichoderma harzianum</i>	40
2.3.11 Preparación de la solución y conteo de UFC/mL	40
2.3.12 Siembra de <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
2.1.13 Resiembra de <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
2.1.14 Preparación y aplicación del inóculo	41
2.4 Análisis Estadístico	42
CAPÍTULO 3	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.1 Impacto en la movilidad y toxicidad de Clorpirifos	43
3.2 Identificación macroscópica y microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i>	48
3.4 Identificación macroscópica y microscópica de <i>Pleurotus ostreatus</i>	51
3.5 Análisis Estadístico de las variables del ensayo.....	53
3.5.1 Temperatura	53
3.5.2 Humedad.....	55
3.5.3 pH.....	56

3.5.4 Biodegradación removida de Clorpirifos ($\mu\text{g}/\text{kg}$).....	60
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Toxicidad Insecticidas Organofosforados: LD ₅₀	12
Tabla 2. Condiciones de degradación de IOP	14
Tabla 3. Insecticidas Organofosforados y tiempos de vida media	17
Tabla 4. Condiciones de degradación de Clorpirifos	19
Tabla 5. Tratamientos del ensayo experimental	34
Tabla 6. Impacto de la movilidad y toxicidad de Clorpirifos.....	43
Tabla 7. Identificación Macroscópica <i>Trichoderma harzianum</i>	48
Tabla 8. Identificación Microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i>	50
Tabla 9. Identificación Macroscópica de <i>Pleurotus ostreatus</i>	51
Tabla 10. Identificación Microscópica de <i>Pleurotus ostreatus</i>	52
Tabla 11. Promedios de InfoStat: Temperatura, ranqueo, C.V y significancia...53	
Tabla 12. Promedios de InfoStat: Humedad, ranqueo, C.V y significancia.....55	
Tabla 13. Promedios de infostat: pH, ranqueo, C.V y significancia	56
Tabla 14. Biodegradación de Clorpirifos: concentraciones.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura Química de la molécula de un IOP.....	10
Figura 2. Estructuras de IOP	11
Figura 3. Degradación de Clorpirifos.....	18
Figura 4. Hidrolisis del Clorpirifos	24
Figura 5. Ruta Shikimato de <i>Trichoderma</i>	25
Figura 6. Degradación de Clorpirifos por <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
Figura 7. Citocromo P-450 monooxigenasas	28

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Georeferenciación	78
Anexo 2. Georeferenciación y toma de muestras	79
Anexo 3. Georeferenciación de puntos de muestreo.....	80
Anexo 4. Información primaria para el Csiro Piri Software	81
Anexo 5. Construcción de la cámara climatizada	82
Anexo 6. Preparación del suelo e inoculación del insecticida	83
Anexo 7. Implementación del diseño experimental.....	84
Anexo 8. Método Olsen Modificado.....	85
Anexo 9. Método de Acetato de Amonio	88
Anexo 10. Método de QUECHERS.....	90
Anexo 11. Método de GC/MS (Cromatografía de gases aplicado a masas).....	91
Anexo 12. Diluciones seriadas para aislar <i>Trichoderma harzianum</i>	92
Anexo 13. Preparación de la solución y conteo de UFC/mL.....	93
Anexo 14. Siembra y resiembra de <i>Pleurotus ostreatus</i>	95
Anexo 15. Preparación y aplicación del inóculo.....	96
Anexo 16. Toxicidad y movilidad calculada por Csiro Piri Software	97
Anexo 17. Análisis de laboratorio.....	101
Anexo 18. Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> a los 5 días.....	120
Anexo 19. Exudado de sustancias aceitosas y amarillentas de <i>P. ostreatus</i>	121

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de los Andes. En Ecuador, la provincia del Carchi es la más representativa con el 32% de la producción. Los IOP's (Insecticidas Organofosforados), como el Clorpirifos, son los agroquímicos mayormente usados por parte de los agricultores en los cultivos de papa. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa, mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. El trabajo se llevó a cabo en dos fases: de campo y de laboratorio. Se utilizó un DCA con cuatro tratamientos (T0: muestra del suelo sin hongo; T1: Muestra de suelo más *Pleurotus ostreatus*; T2: muestra de suelo más *Trichoderma harzianum*; T3: Muestra de suelo sin *Pleurotus ostreatus* sin *Trichoderma.harzianum*) y cuatro repeticiones. Se utilizaron ADEVAS con un Tuckey del 5% para variables con significancia. El T3 resultó el mejor tratamiento con el 66.80% de insecticida biodegradado a través de los procesos enzimáticos como el uso de las enzimas P-450 monooxigenasas en *Trichoderma harzianum* y la Ruta del Shikimato en *Pleurotus ostreatus* incorporando el insecticida a sus procesos metabólicos. Se aceptó la hipótesis alternativa que establece que la biodegradación de un IOP en muestras de suelo de cultivo de papa es posible mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. Por lo tanto, la biorremediación es una herramienta mucho más eficaz y eficiente que los procesos físico-químicos convencionales, más caros e ineficientes.

Palabras clave: Micorremediación, clorpirifos, Csiro Piri Software

ABSTRACT

The potato (*Solanum tuberosum L.*) is native of the Andes Region. In Ecuador, Carchi is the most representative province with 32% of production. The IOP's (Organophosphorus Insecticides) such as Chlorpyrifos, are agrochemicals mostly used by potato farmers. The objective is to evaluate the biodegradation efficiency of an organophosphorus insecticide in potato soil samples by the application of *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus ostreatus*. The work was carried out in two phases: field and laboratory. In this work it was used a DCA with four treatments (Soil sample with *Pleurotus ostreatus*, T2: soil sample with *Trichoderma harzianum*, T3: Soil sample with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum*) and four replicates. In addition, ADEVAS was used with a Tuckey of 5% for variables with significance. T3 was the best treatment with 66.80% of biodegraded insecticide through the enzymatic processes of each applied fungi as the use of P-450 enzymes in *Trichoderma harzianum* and the Shikimato Route in *Pleurotus ostreatus* incorporating the insecticides to their metabolic processes.

It was accepted the alternative hypothesis that establishes that the biodegradation of an IOP in soil samples of potato cultivation is possible by the application of *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus ostreatus*. Therefore, bioremediation is a much more effective and efficient tool than the more expensive and inefficient, physical-chemical conventional processes.

Key words: Micorremediation, chlorpyrifos, Csiro Piri Software

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de los Andes. Se produce en todo el mundo, especialmente en climas templados. Es considerado el tercer cultivo más importante a nivel mundial después del trigo y el arroz con 385 millones de toneladas de tubérculos producidos en 19.2 millones de hectáreas (INIAP, 2016).

La agricultura es una de las actividades productivas con mayor impacto en el ambiente. En las tres regiones del Ecuador, el monocultivo se apodera de los paisajes y de grandes áreas de terreno (Rivas, 2010). La Sierra ecuatoriana sin duda alguna, es la región agroproductiva más destacada, tanto por los productos que se obtienen como por sus rendimientos, siendo el cultivo de papa uno de los más sobresalientes.

En Ecuador, la papa es uno de los principales cultivos que vincula a más de 82 000 productores (INIAP, 2016). Según el (MAGAP, 2013) el cultivo de papa, actualmente vincula a 88 130 productores. Además, al menos 250 000 personas están involucradas directa e indirectamente con este cultivo (MAGAP, 2013). Aproximadamente el 81% de la producción es comercializado para consumo interno (INIAP, 2016).

La papa se produce en las diez provincias de la Sierra ecuatoriana, siendo la más representativas: Carchi (32%), Cotopaxi (19%), Chimborazo (14%), Tungurahua (14%) y Pichincha (10%), abarcando el 89% de la producción a nivel nacional (MAGAP, 2013). Las variedades cultivadas, preferentemente en la zona Norte son: Superchola, Gabriela, Esperanza, Roja, Friepapa y María; en la zona centro: las variedades nativas Uvilla y Leona

Blanca así como Gabriela, Esperanza, Friepapa y María; y en la zona sur: Esperanza, Gabriela, Bolona y Jubaleña (Agroecuador, 2014). Según el (INIAP, 2016) la región sierra norte ubicada a una altitud de 2 800 a 3200 m.s.n.m., alberga a los mayores productores de papa a nivel nacional, destacándose los cantones: Tulcán, Montúfar, Espejo y Huaca de la provincia del Carchi, con una producción anual aproximada del 40%.

La producción de papa en esta provincia se ve amenazada por plagas como el gusano blanco (*Pemnotrypex vorax* Hustache) y por insectos masticadores como el minador (*Liriomyza* sp.) y la polilla (*Tecia solanivora*) (INIAP, 2016), considerados un problema fitosanitario. Los agricultores emplean agroquímicos como la alternativa imperante para el control de estas plagas (Gallegos, y otros, 2010). Según (Aldás, 2012) estos productos químicos se adquieren sin un previo criterio técnico y por recomendación de otro agricultor causando un grave problema de contaminación a nivel del recurso suelo, agua y aire. El objetivo es incrementar la productividad en un corto periodo de tiempo por encima de la sustentabilidad ecológica, dejando un alto nivel de contaminación como resultado (Del Puerto, Suárez, & Palacio, 2014). Cabe destacar que cada vez la capacidad adquisitiva de agroquímicos por parte de los agricultores es mayor, lo que desemboca en un mayor uso de agroquímicos para el control de plagas (Gallegos, y otros, 2011). Además, existe escasa conciencia ambiental por parte de los habitantes y la falta de aplicación de mecanismos de control por parte de las instituciones públicas y privadas ha llevado a que estos insumos se sigan empleando de manera inconsciente (Aldás, 2012).

El uso inadecuado de agroquímicos es un problema que concierne no sólo a agricultores sino también a ambientalistas (Gallegos, y otros, 2011). Según (UNODC, 2010) el uso de

estos productos dificulta la preservación de: los ecosistemas, los recursos naturales, la salud de las comunidades rurales así como la calidad de la papa y sus rendimientos.

Los plaguicidas químicos, como los insecticidas, han proporcionado una mejora significativa en la producción agrícola, sin embargo, también han ejercido un importante efecto adverso en el ambiente debido a su toxicidad, elevada bioacumulación en productos de consumo local sobrepasando los límites permisibles, así como su persistencia en suelo, agua y aire. La aplicación de los plaguicidas y los residuos generados, el mal manejo y la disposición incontrolada de los mismos, son las principales causas de contaminación ambiental, principalmente del recurso suelo debido a su elevada adsorción sobre la materia orgánica, su baja volatilidad y estabilidad química que les confiere un bajo grado de movilidad y una elevada persistencia. La volatilización y la disolución en cuerpos de agua son importantes mecanismos de dispersión de la contaminación (Semple, Morriss, & Paton, 2003).

Los IOP's (Insecticidas Organofosforados) son los agroquímicos mayormente usados por parte de los agricultores. Estos presentan menor persistencia que los organoclorados debido a los procesos de transformación ambiental que se efectúan más eficientemente sobre los enlaces fosfoéster de estas moléculas. A pesar de ello, la degradación parcial genera subproductos de mayor toxicidad que los compuestos parentales (Vittozzi, Di Consiglio, & Testai, 2001) citado por (Narváez, Palacio, & Molina, 2010) ocasionando resistencia por parte de las plagas, contaminación ambiental, toxicidad.

Se ha visto afectada la microbiota del suelo, ha disminuido la materia orgánica del mismo tornando al suelo insuficiente e improductivo a largo plazo. A pesar de ello representan en este sentido un avance dentro del sistema agroproductivo del país (Baird, 2001). Todos los insecticidas organofosforados poseen un átomo de fósforo pentavalente al cual se unen otras moléculas (Baird, 2001).

Según el Plan Nacional del Buen Vivir emitido por la (SENPLADES, 2013) es importante: “fomentar la investigación en biotecnología en el país con el fortalecimiento de institutos de investigación y universidades”; es decir hacia la producción futura de bioplaguicidas a través de metabolitos secundarios micóticos y a la aplicación de investigación biotecnológica de calidad. Es importante destacar la importancia de rescatar sistemas agroproductivos que busquen aumentar sus rendimientos sin la aplicación de insecticidas organofosforados respetando la naturaleza y todas sus formas de vida.

Por estas razones, el presente trabajo busca reducir la cantidad de IOP's presentes en el suelo de un cultivo de papa a través de un proceso de biodegradación mediante el uso de la maquinaria enzimática de un basidiomiceto (*Pleurotus ostreatus*) y un deuteromiceto (*Trichoderma harzianum*) desdoblado la molécula del insecticida y la posterior bioremediación del suelo por agentes fúngicos.

Un gran número de enzimas de hongos están implicadas en la biodegradación de contaminantes orgánicos altamente tóxicos. En los últimos años las nuevas tecnologías han hecho énfasis en el desarrollo y aplicación de estrategias de remediación sostenibles como los complejos enzimáticos. La información sobre estrategias enzimáticas de oxido-

reductasas e hidrolasas entre otras enzimas han sido estudiadas a profundidad (Karigar & Rao, 2011).

Estas estrategias, denominadas como: “tecnologías de biorremediación”, son menos costosas y menos destructivas con el medio ambiente comparadas con las tecnologías de tratamientos físicos y químicos, mismos que son más costosos, generan un impacto y definitivamente no son efectivos para realizar este tipo de recuperación ambiental (Atlas & Unterman, 1998). La biorremediación es un proceso biotecnológico rentable y amigable con la naturaleza (Karigar & Rao, 2011) es un tratamiento tecnológico de descontaminación que usa sistemas biológicos para catalizar la destrucción o transformación de componentes peligrosos en el ambiente (Atlas & Unterman, 1998) como es el caso de la biorremediación micótica o micorremediación.

La biorremediación micótica es una herramienta que permite degradar las moléculas de un IOP a través de su maquinaria enzimática desdoblando la molécula del compuesto en una más sencilla y menos persistente. Las principales ventajas de estos hongos son la tolerancia a concentraciones considerablemente altas de contaminantes y su capacidad para crecer a bajos valores de pH. Además gracias a la extensión de sus hifas, puede alcanzar contaminantes en el suelo, que no son biodisponibles ni biodegradables para otros organismos (Quintero, 2011).

Durante los últimos veinte años se ha orientado la atención a los hongos de pudrición blanca, basidiomicetos como *Pleurotus ostreatus* y su sistema enzimático ligninolítico

(Manjarrés, Castro, & Rodríguez, 2010), para estudiar la capacidad degradativa un amplio rango de compuestos xenobióticos como plaguicidas (Quintero, 2011).

Se ha observado que gran número de compuestos entre ellos los plaguicidas y específicamente, los insecticidas, no responden al proceso degradativo de las enzimas ligninolíticas y esto ha permitido descubrir recientemente nuevos mecanismos empleados por estos hongos como son los sistemas oxidativos de las monooxigenasas del citocromo P-450 y reductivo de las transferasas, ya ampliamente conocidos en animales superiores e identificados como fase I y fase II del metabolismo (Quintero, 2011).

El cultivo del género *Pleurotus* spp. (Garzón & Cuervo, 2008), perteneciente a la familia Phanerochaete (Frazar, 2000), conocidos como hongos ostra u orellana, permiten descomponer un gran número de contaminantes en suelos estériles y no estériles. De hecho, son considerados prometedores en su aplicación como biorremediadores de suelos contaminados (Novoynny, y otros, 2001).

Trichoderma spp. son hongos anamórficos aislados principalmente del suelo (Chávez, 2006). Poseen resistencia a la mayoría de agroquímicos. Recientemente, (Tang, y otros, 2010) informaron de proteínas de *Trichoderma* diferencialmente expresadas en respuesta al diclorvo y sometidas a estrés agroquímico con el fin de comprender qué proteínas están implicadas en la tolerancia a la sustancia química o son responsables de la regulación del proceso de degradación de la sustancia química (Tripathi, Poonam, Mishra, Puneet, & Dwivedi, 2013). La cepa *Trichoderma harzianum* es capaz de utilizar el insecticida organofosforado, profenofos o clorpirifos por ejemplo, como fuente de azufre y de

fósforo, y de degradar ácido aminometil fosfórico en insecticidas como el clorpirifos y diclorvos (Argumendo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009). Cepas de *Trichoderma harzianum* han sido altamente competitivas en la rizosfera de las plantas, aumentando el desarrollo de la raíz cuando la planta está con una alta acumulación de toxinas, incrementando también el volumen de suelo explorado por las raíces y la penetración profunda de éstas (Castro & Rivillas, 2012).

El objetivo general del trabajo investigativo fue evaluar la eficiencia de biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa, mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. Los objetivos específicos que ayudaron a cumplir este objetivo fueron: diagnosticar las condiciones agroclimáticas de la zona del cultivo de papa para el aislamiento de *Trichoderma harzianum*; obtener las esporas de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* por técnicas microbiológicas; analizar la concentración del insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa; y evaluar por espectrofotometría la capacidad biotransformadora de *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* al final del ensayo en el suelo de un cultivo de papa. Además se empleó el programa estadístico Csiro Piri Software para determinar el diagnóstico y las condiciones agroclimáticas del lugar muestreado (Kookana, Corell, & Miller, 2014).

Se han planteado dos hipótesis al trabajo investigativo: la hipótesis nula donde se establece que la biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa no es posible mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*; y la hipótesis alternativa donde la biodegradación de un insecticida

organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa es posible mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en dos fases: de campo y de laboratorio. La fase de campo involucró la georreferenciación, el muestreo y el transporte de las muestras tanto del deuteromiceto como del basidiomiceto, en las provincias de Carchi y Pichincha, respectivamente. La fase de laboratorio abarcó los análisis físico-químicos en el Laboratorio de la UPS (Universidad Politécnica Salesiana) en Cayambe de las muestras de suelo y agua del cultivo de papa. Los análisis de la concentración del insecticida al inicio y final de la parte experimental se realizaron en el laboratorio de la Comisión de Energía Atómica del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable. En los laboratorios del Centro de investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización Taxonómica de las cepas de los hongos a través de la Taxonomía de Barnett y de técnicas microbiológicas como los microcultivos.

Se utilizó un DCA (Diseño Completamente al Azar) con cuatro tratamientos (T0: muestra del suelo sin hongo; T1: Muestra de suelo con insecticida más *Pleurotus ostreatus*; T2: muestra de suelo con insecticida más *Trichoderma harzianum*; T3: Muestra de suelo con insecticida *Pleurotus ostreatus* más *Trichoderma harzianum*) y cuatro repeticiones con concentraciones promedio de: 2.88×10^7 UFC/mL para *Trichoderma harzianum* y 2.66×10^7 UFC/mL para *Pleurotus ostreatus*. Dentro del análisis estadístico se utilizó ADEVAS con un Tuckey del 5% para variables con significancia.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Plaguicidas

Se define *plaguicida* como “sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales” (FAO, 2010). También se define como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o a regular el crecimiento de las plantas” (FAO & OMS, 2015).

1.1.1 Clasificación de los plaguicidas

Los plaguicidas presentan una clasificación muy amplia; sin embargo, entre las más conocidas e importantes se citan las siguientes: (Ramírez & Lacasaña, 2014):

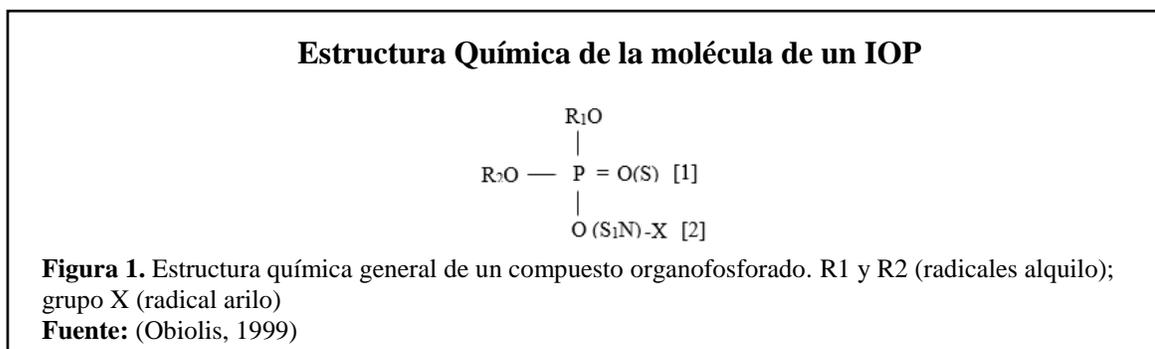
- Clasificación según su toxicidad expresada en DL₅₀ (mg/kg): Clase IA-extremadamente peligrosos; Clase IB-altamente peligrosos; Clase II-moderadamente peligrosos; Clase III-ligeramente peligrosos.
- Clasificación según su vida media efectiva: no persistente, moderadamente persistente, persistente y permanente.
- Clasificación según la familia química: organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, derivados bupiridilos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados cloronitrofenólicos, derivados de triazinas, compuestos orgánicos del estaño, compuestos inorgánicos, compuestos de origen botánico.

1.1 Insecticidas Organofosforados

Los IOP son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados (Fernández, Mancipe, & Fernández, 2010).

1.1.1 Estructura química y clasificación

La estructura química general que presentan los insecticidas organofosforados es:



Los IOP pueden clasificarse en función de la sustitución de sus radicales. Según (Badii & Varela, 2007) existen 14 grupos y entre los más importantes se encuentran:

- **Fosfatos:** Un O en las posiciones [1] y [2]
- **O-fosfortioatos (o tionatos):** Un S en [1] y un O en [2]
- **S-fosfortioatos (o tiolatos):** Un S en [2] y un O en [1]
- **Fosforoditioatos (o tiolotionatos):** Un S en [1] y en [2]
- **Fosforoamidatos:** Un O en [1] y un N en [2]
- **Fosfonatos:** Con R1: S u O en [1] y O en [2]

La mayoría de los organofosforados pueden agruparse en: fosfatos, fosfortionato, fosforoditioato, forforotiolato, fosforodiamidato, pirofosfato, fosfanato y fosfotionato, teniendo una acción sistémica como de contacto dependiendo del cultivo al cual se exponga (Badii & Varela, 2007).

Estructuras de IOP

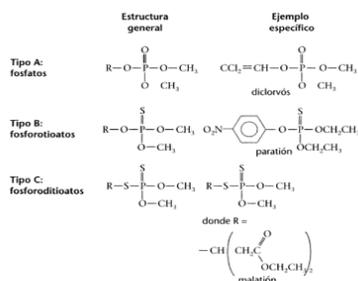


Figura 2. Tipos de estructuras de insecticidas organofosforados. En algunas moléculas, el grupo metoxi es substituido por un etoxi

Fuente: (Baird, 2001)

1.1.2 Propiedades de los organofosforados

Los compuestos organofosforados presentan tres características (Badii & Varela, 2007):

- a. Liposolubles:** Al ser compuestos básicamente apolares (no se disuelven en agua con facilidad pero si en grasas) se absorben fácilmente a través de la piel y las mucosas atravesando fácilmente estas barreras biológicas.
- b. Mediana tensión de vapor:** Esto hace que sean volátiles facilitando la absorción inhalatoria.
- c. Degradables:** Sufren hidrólisis en medio alcalino y en líquidos biológicos. Aunque se dice que no son persistentes en el ambiente, si generan un impacto considerable debido a las cantidades a las que son expuestos sobre todo en el sector agrícola.

Cabe acotar, la estabilidad de los organofosforados va a depender del pH del medio; es decir, cuando el pH es fuertemente alcalino se descomponen. Esta propiedad puede ser utilizada para destruirlos en procesos posteriores (Benedico, 2002).

1.1.3 Usos de los organofosforados

Los insecticidas organofosforados de uso doméstico y agrícola presentan concentraciones de aplicación muy bajas, varía entre: 0.5 a 5.0 %. Se venden bajo en forma de aerosoles, cintas repelentes y soluciones líquidas (Benedico, 2002).

1.1.4 Toxicidad de los IOP

Existen cuatro vías de entrada de los IOP como: respiratoria, cutánea-mucosa, digestiva, y parenteral por medio de las cuales se inicia el efecto tóxico de los componentes organofosforados. La toxicidad de los compuestos organofosforados se rige bajo tres parámetros: toxicidad muy alta (Metamidofos) (Benedico, 2002) con un CL_{50} de 6.26 $\mu\text{g/mL}$ a las 24h de exposición y de 0.11 $\mu\text{g/mL}$ a las 48h (Jaramillo, Martelo, & Duarte, 2013); toxicidad moderada (Clorpirifos y Fentiión) y toxicidad baja (Malatiión) (Benedico, 2002) con valores de CL_{50} mayores de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Jaramillo, Martelo, & Duarte, 2013).

Considerando la DL_{50} como la cantidad letal necesaria para matar al 50% de la población, se muestra en la Tabla 1 algunos de los IOP más consumidos en el mercado local junto al DL_{50} de cada uno de ellos expresado en mg/kg .

Tabla 1. Toxicidad Insecticidas Organofosforados: LD_{50} .

Insecticida	Toxicidad LD_{50} (mg/kg)	Insecticida	Toxicidad LD_{50} (mg/kg)
Clorpirifos	135-163	Dicrotofos	15-22
Paratiión	2-10	Diazinon	80-300
Metil paratiión	3-30	Dimetoato	160-387
Monocrotofos	18-20	Fenitrotiión	1700

Nota: Tomado de (Singh & Walker, 2006)

La toxicidad suele representarse bajo un color de etiqueta específico. Los IOP's, según la clasificación de la (OMS, 2000), denominados sumamente peligrosos y muy peligrosos tiene una etiqueta, roja; aquellos que son moderadamente peligrosos, amarilla; poco peligrosos, azul; y normalmente no peligrosos o que no ofrecen peligro, verde.

1.1.5 Mecanismos de acción de los IOP

Los IPO's se absorben fácilmente atravesando la barrera hematoencefálica ya que son muy liposolubles, de volatilidad variable, vida media corta en plasma y elevado volumen de distribución en tejidos (Obiolis, 1999). Estos presentan dos tipos de inhibición enzimática específica: la primera, inhibición de la enzima acetilcolinesterasa que produce aumento de la acetilcolina en terminaciones motoras y una contracción muscular llegando a ocasionar fasciculaciones y bloqueo neuromuscular; y la segunda, inhibición de la esterasa neurotóxica-esterasa donde la unión IOP-AC es fuerte, pero susceptible de ser desactivada con la administración precoz de oximas (Badii & Varela, 2007).

1.1.6 Dosis de IOP más usados

Dos de los productos más empleados en el sistema agrario del Ecuador son: Lorsban 4E y Latigo EC. Lorsban 4E se emplea en plagas de follaje: de 250 a 500cc/200 L/agua y de 0.75 a 1 L/ha, y en plagas de suelo: de 0.5 a 1.0 L/ 200 L agua. En el caso Latigo*EC se aplica de 150 a 200 cc/200 L de agua (Farmagro, 2012).

1.1.7 Condiciones de degradación de los IOP

Según (Morell & Hernández, 2000) la degradación de los IOP está en función de algunos factores como: el contenido de arcillas (los insecticidas presentan una alta capacidad de adsorción frente a plaguicidas cargados positivamente: a mayor contenido arcilloso, mayor capacidad de adsorción) contenido de materia orgánica (contribuye a la adsorción del plaguicida, favorece los procesos de transformación y degradación, y afecta a la bioactividad, bioacumulación, biodegradación, lixiviación y volatilidad), textura (el porcentaje de arena, limo y arcilla influye en el lixiviado o percolación del plaguicida), estructura (viene dado por la textura y el contenido en materia orgánica), porosidad (el transporte es más rápido a través de suelos porosos), humedad (a mayor humedad, mayor adsorción y solubilidad de los plaguicidas.), temperatura (influye directamente en la humedad del suelo y en la volatilización del plaguicida), y finalmente, el pH (presenta distinto comportamiento en función del suelo). En la Tabla 2, se presentan las condiciones de degradación de algunos IOP's.

Tabla 2. Condiciones de degradación de IOP

IOP	Tiempo	pH del suelo	Temperatura
Diazinon	1.2 a 5 semanas (suelos no estériles) 6.5 a 12.5 semanas (suelos estériles)	>6	20 °C
Dimetoato	4 días 122 días	9 7	-
Monocrotofos	96 días 66 días 17 días	5 7 9	-
Paratión	Varias semanas	>7	
Metil paratión	10 días- 2 meses	-	-
Fenitrotión	4.4 años	7.2	-

Nota: Tomado de (FAO, 2017).

1.1.8 Efectos

- **Efectos en el ambiente**

Los organofosforados (derivados del ácido fosfórico) son los más tóxicos y menos estables en el ambiente en relación a los organoclorados (Del Puerto Rodríguez, Suárez, & Palacio, 2014). Los IOP son poco persistentes en el ambiente, pero causan grandes impactos. Generalmente, el producto llega al suelo y a cuerpos de agua como resultado del lavado, lixiviación y escorrentía ocasionado por las lluvias, por el arrastre provocado por el viento o por la aplicación directa produciendo la muerte de los organismos y microorganismos de este medio (Badii & Varela, 2007). Existen factores que afectan la capacidad de un plaguicida para contaminar el agua: solubilidad en agua, distancia del sitio de aplicación al cuerpo de agua, el clima, el tipo de suelo, la presencia de un cultivo en crecimiento y los métodos para aplicar el producto químico (García & López, 2013).

Los plaguicidas se dispersan suspendidos en el aire en forma de partículas influenciadas por la temperatura y la humedad relativa modificando su propagación. Aquellos que se utilizan para fumigar el suelo producen compuestos orgánicos volátiles (COV) que reaccionan con los gases de la atmósfera formando el ozono troposférico (García & López, 2013). Según (Del Puerto Rodríguez, Suárez, & Palacio, 2014) la contaminación del aire tiene importancia cuando la aplicación es a través de medios aéreos abarcando grandes extensiones de tierra y debido al tamaño de las partículas el "arrastre" de estas a zonas vecinas es un problema sin duda alguna sobre todo cuando las zonas contaminadas están habitadas o con cultivos. En general se volatilizan desde el suelo, fenómeno que depende sobre todo de la presión de vapor, la solubilidad del plaguicida en agua, las condiciones

ambientales y la naturaleza del sustrato tratado (Del Puerto Rodríguez, Suárez, & Palacio, 2014).

Muchos de los insecticidas empleados en la agricultura son contaminantes persistentes del suelo afectando fuertemente la conservación de la microbiota del suelo. El uso de los plaguicidas disminuye fuertemente la biodiversidad en el suelo. Se debe considerar la incidencia de los insecticidas en el suelo a nivel del recurso agua. Es decir, a mayor cantidad de materia orgánica, mayor es la retención de agua, menor cantidad de materia orgánica en el suelo aumenta la cantidad de pesticida considerando el área de aplicación porque la materia orgánica se une y ayuda a descomponer los pesticidas (Badii & Varela, 2007). Los herbicidas, por ejemplo, pueden reducir la cubierta vegetal del suelo, promoviendo así el suelo Erosión por escorrentía y viento. La erosión del suelo deforma su estructura y la fertilidad del suelo se va afectada por esta condición. Una tierra desnuda con mala fertilidad del suelo apoya el crecimiento de las plantas en él y ecológicamente esta tierra no puede soportar otras formas de vida (Silva & Correa, 2009).

El plaguicida Diazinon es uno de los más persistentes. La vida media de este en el suelo es de 90 días; el Malation o el Paration, poseen una persistencia de apenas unas semanas. Cabe acotar que el Paration puede llegar a bioacumularse en forma de paraoxon, el cual es más persistente que su precursor (Badii & Varela, 2007). El tiempo de vida media de los IOP va a variar dependiendo de la molécula que conforme el producto. En la Tabla 3, se muestran algunos insecticidas organofosforados junto a su tiempo de vida media.

Tabla 3. Insecticidas Organofosforados y tiempos de vida media

Insecticida	Tiempo de vida media en suelo	Insecticida	Tiempo de vida media en suelo
Clorpirifos	10-120	Dicrotofos	45-60
Paratión	30-180	Diazinon	11-21
Metil paratión	25-130	Dimetoato	2-41
Monocrotofos	40-60	Fenitrotión	12-28

Nota: Tomado de (Singh & Walker, 2006)

• Efectos sobre la salud

Los efectos en la salud dependen de: el tipo de IOP, la vía de entrada, la dosis y la susceptibilidad individual generándose algunos síndromes (Ramírez & Lacasaña, 2014): colinérgicos (periodo de latencia de 30-60 minutos), intermedios (parálisis de las extremidades y flexores del cuello), así como neuropatías retardadas (es una degeneración axonal que desarrolla una polineuropatía distal y simétrica-periférica-central). Entre las complicaciones más frecuentes se encuentran: insuficiencia respiratoria grave y complicaciones neurológicas. Cabe acotar que las arritmias cardíacas pueden ser graves llegando a producir la muerte. La mortalidad aumenta con la entrada digestiva, etiología voluntaria y las complicaciones respiratorias, del SNC o cardiocirculatorias (Del Puerto Rodríguez, Suárez, & Palacio, 2014).

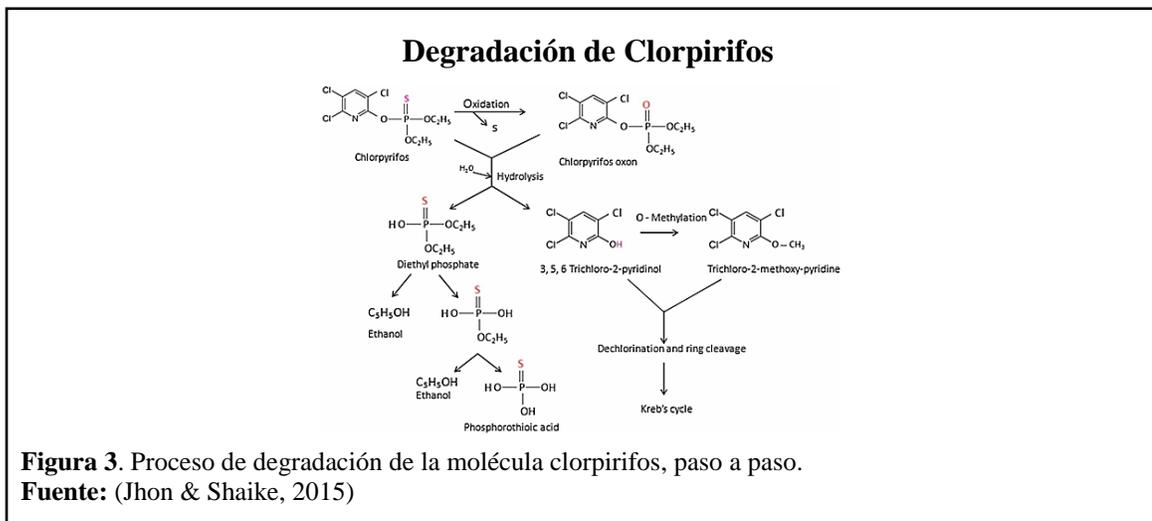
1.2 Clorpirifos

Estos compuestos organofosforados poseen actividad insecticida de amplio rango, son ampliamente usados en la agricultura pero también son altamente tóxicos para los mamíferos. Con este insecticida se han realizado pocos trabajos para estudiar su biodegradación (Quintero, 2011).

1.2.1 Proceso de degradación de la molécula Clorpirifos

La enzima microbiana hidrolasa organofosforada u organofosfohidrolasa ha sido reportada en el citoplasma de muchos microorganismos. Esta rompe eficazmente el enlace P-O fosfotriéster y la unión P-S en los fosfotiolésteres siendo estos el caso del Clorpirifos donde se generan dos metabolitos principales: el 3,5,6-tricloro-2-piridinol y el dietilfosfato (DETP) (Jhon & Shaik, 2015).

Cuando se realiza la degradación de cantidades pequeñas de clorpirifos se producen otros metabolitos tales como: desetil clorpirifos, clorpirifos oxon, desetil clorpirifos oxon y 3,5,6-tricloro-2 metoxi-pirimidina. Clorpirifos oxon es la forma oxidada de clorpirifos y se hidroliza tanto enzimáticamente como espontáneamente para formar dietilfosfato y 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Este último puede degradarse adicionalmente a 3,5,6-tricloro-2-metoxi-piridina y dióxido de carbono (Jhon & Shaik, 2015).



1.2.2 Condiciones de degradación de Clorpirifos

Las condiciones de degradación requieren de factores importantes como son la temperatura, el viento, la humedad e indiscutiblemente el pH. Tanto ácidos como bases pueden actuar como catalizadores activando ciertos grupos funcionales y preparando el

ataque de nucleófilos y electrófilos del entorno. En el caso de la degradación de clorpirifos factores como pH y temperatura son muy importantes ya que influyen en el tiempo mismo de degradación (Tabla 4) según (Macalady & Wolfe, 1983) citado por (Narváez, Palacio, & Molina, 2010).

Tabla 4. Condiciones de degradación de Clorpirifos

Tiempo (días)	pH	Temperatura (C°)
10	9.77	25
53	5.9	25
142	6.11	25

Nota: Tomado de (Macalady & Wolfe, 1983)

La degradación de Clorpirifos se ve influenciada principalmente por procesos hidrolíticos. La hidrólisis química de plaguicidas, potencia el efecto de otros procesos de transformación, debido a que los metabolitos de la hidrólisis pueden ser más fotosensibles o menos tóxicos para los microorganismos que los compuestos parentales. En el caso de algunos organofosforados una hidrólisis inicial conduce a la formación de p-nitrofenoles, los cuales son fácilmente degradados a hidroquinonas por bacterias como *Pseudomona putida* (Rani & Lalithakumari, 1994). Estos productos de degradación, representan menor toxicidad para los organismos acuáticos (Narváez, Palacio, & Molina).

1.3 Biorremediación

Es una tecnología que utiliza microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) y su potencial metabólico y enzimático para transformar contaminantes orgánicos complejos y de difícil degradación en compuestos más simples, poco o nada contaminantes (Glazer & Nikaido, 1995). Una de las ventajas del empleo de biorremediación en suelos, frente a tratamientos físicos y químicos ya estandarizados está en que se basan en la transferencia

del contaminante de un medio a otro para su óptima eliminación. Generalmente, no requiere de componentes estructurales o mecánicos por lo que su costo es menor frente a otras tecnologías (Glazer & Nikaido, 1995).

1.3.1 Tipos de biorremediación

El campo de la biorremediación es muy amplio. Los tipos de biorremediación van a depender del lugar y del modo de acción, así como de mecanismo de los agentes naturales que se empleen a fin de obtener un producto menos o nada nocivo tras su tratamiento.

Entre los tipos de biorremediación más utilizados están:

- a) **Fitorremediación:** Constituye una estrategia muy interesante debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos (FQUIM, 2006).
- b) **Remediación microbiana:** Se basa en el uso directo de microorganismos (autóctonos o inoculados) en el lugar contaminado, ya que estos tienen la maquinaria enzimática y metabólica que permite, a través de enzimas, toxinas y metabolitos secundarios, degradar sustratos contaminados o contaminantes transformando naturalmente moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas (FQUIM, 2006).
- c) **Degradación enzimática:** Consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Además de hidrolizar estos polímeros, existen enzimas capaces de degradar compuestos altamente tóxicos. Estas son utilizadas en tratamientos en donde los microorganismos no

pueden desarrollarse debido a la alta toxicidad de los contaminantes (FQUIM, 2006).

1.3.2 Micorremediación

Es un técnica que se basa en el uso de hongos para degradar o remover toxinas del ambiente. En los últimos años la biorremediación ha estado direccionada al uso de bacterias, principalmente, dejando de lado la gran capacidad biorremediadora de los hongos. La micorremediación se fundamenta en la excelente capacidad enzimática de los hongos para transformar una amplia variedad de compuestos orgánicos y en algunos casos, de mineralizarlos ya sea por enzimas intracelulares o por enzimas excretadas al medio (Medauraa, y otros, 2013).

1.3.2.1 *Trichoderma harzianum*

- **Taxonomía**

Pertenece al reino fungi, división Mycota, sub-división Eumycota, clase: Hyphomycetes, orden: Moniliales, familia: Moniliaceae, género: *Trichoderma*, especie: *harzianum* (Cholango, 2009).

- **Características de *Trichoderma harzianum***

El género *Trichoderma* se caracteriza por formar colonias blancas simulando una película sobre el medio de cultivo en el cual crece. Este micelio está formado por hifas septadas. Los conidióforos por segmentos cortos que se hallan de lado y lado de la hifa, mostrando así en la parte terminal pequeños conidios redondeados. La esporulación da como

resultado colonias de color verde oscuro homogéneo que, con el pasar del tiempo se tornan de color verde oscuro intenso (Guzmán, 1977).

- a) **Características Microscópicas:** Los conidióforos se ramifican de forma piramidal, con ramas cortas en las puntas y, en la parte inferior, más largas. Las fiálides se encuentran en agrupaciones de 3 a 5 a manera de botella, 4-7 x 2.5-3.5 μm . Los conidios son subglobosos u ovoides, de paredes lisas, hialinos a verde pálido 2-5, 3.0 x 2.0-2.5 μm (Arias, 2008).
- b) **Características Macroscópicas:** Presenta una coloración blanco verdosa que, con el tiempo, se torna verde oliva formando anillos concéntricos. Alcanzan un diámetro de 9 cm en 7 días a 25°C. El revés, generalmente es crema tendiendo a beige (Arias, 2008).

Trichoderma harzianum es capaz de utilizar el insecticida organofosforado como fuente de azufre y fósforo sin dejar de lado algunos nitratos y otros iones presentes en el suelo (Castro, 2012).

- **Mecanismos de acción**

Son tres los mecanismos involucrados en la biorregulación de organismos patógenos por parte de *Trichoderma*:

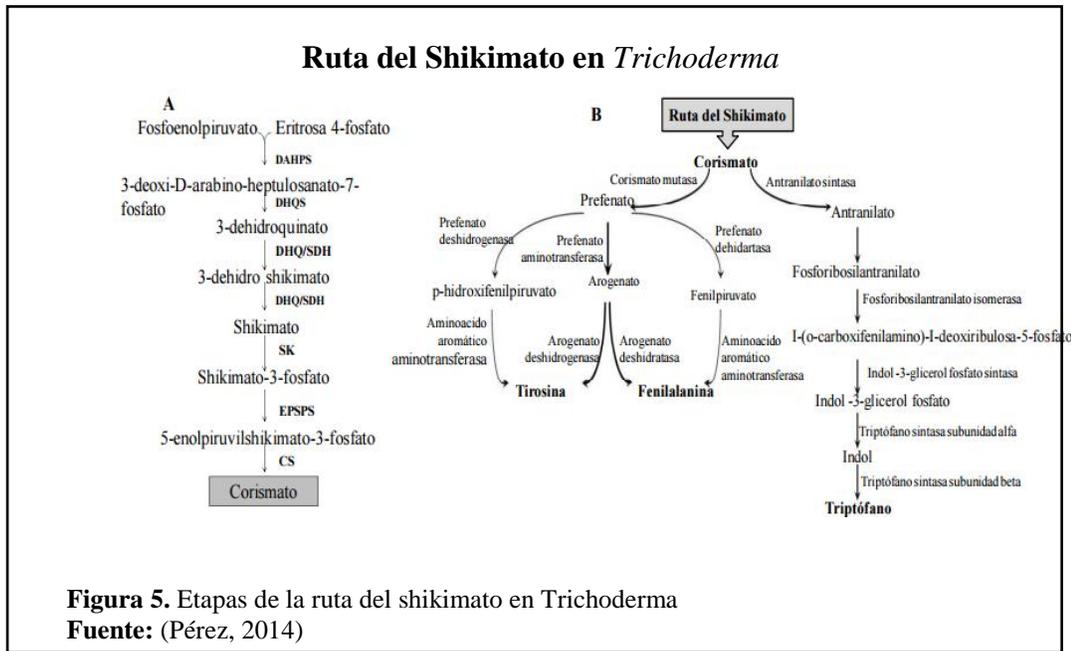
- a) **Micoparasitismo:** Es un proceso complejo que involucra la producción de enzimas líticas como: quitinasas, glucanasas, celulasas, xylanases, laminarinasas, esterases, glucosidasas, lipasas y proteasas. La hifa de *Trichoderma* entra en contacto con la hifa del hongo patógeno e inicia el crecimiento alrededor de la hifa. Por acción enzimática comienza la degradación de la hifa del patógeno y ocurre

penetración por parte del hongo antagonista, causando degradación celular, rompimiento hifal y destrucción total de la hifa del patógeno (Castro, 2012).

- b) Antibiosis:** *Trichoderma* tiene la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles como: 2-propanona, 2-metil-1-butanol, heptanal, octanal, nonanal y decanal. La actividad antibiótica se refiere a los compuestos no volátiles dentro de los cuales existe un gran número de compuestos de importancia en la actividad biorreguladora (Castro, 2012).
- c) Competencia:** Este hongo tiene una rápida tasa de desarrollo, lo que hace que sea un fuerte competidor por espacio a la hora de colonizar la rizosfera. Por otra parte *Trichoderma*, tiene una capacidad superior de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo, siendo muy versátil para utilizar sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, lo que le permite colonizar un medio rápidamente, evitando la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat (Castro, 2012).

- **Metabolismo de Clorpirifos**

El metabolismo se produce principalmente por hidrólisis a través de esterasas (Picco, Rodríguez, & Boggio, 2011). Tanto las reacciones hidrolíticas y las transferasas afectan a los tioatos y a sus axones. Numerosas reacciones siguen el proceso del metabolismo primario. La biotransformación específica de los grupos sustituyentes en R^1 , R^2 y X pueden ocurrir por la escisión de los enlaces directos C-P de los fosfonatos y fosfinatos que pueden presentarse hasta las etapas finales de la biodegradación (Inchem, 1972).



1.3.2.2. *Pleurotus ostreatus*

- **Taxonomía**

Pertenece al reino Fungi; filo Baidiomycota, clase Homobasidiomycetes, orden Agaricales, familia Pleurotaceae, género *Pleurotus*, especie *ostreatus* spp (Carvajal, 2010).

- **Características de *Pleurotus ostreatus***

Es un hongo filamentoso del tipo basidiomiceto que se encuentra dentro de la categorización los *hongos de podredumbre blanca*. Representan alrededor del 75 % de la biomasa microbiana en suelos, con redes que se extienden a lo largo de cientos de hectáreas (Harms, Schlosser, & Wick, 2011). Son considerados degradadores eficientes de la lignina catalizando su degradación mediante una maquinaria enzimática basada en radicales libres y con baja especificidad de sustrato. Los materiales lignocelulósicos son los sustratos ideales para la aplicación de los hongos de podredumbre blanca en suelos contaminados. Su sistema ligninolítico es extracelular, esto le permite degradar los sustratos sin tener que internalizarlos, permitiendo la oxidación de compuestos poco

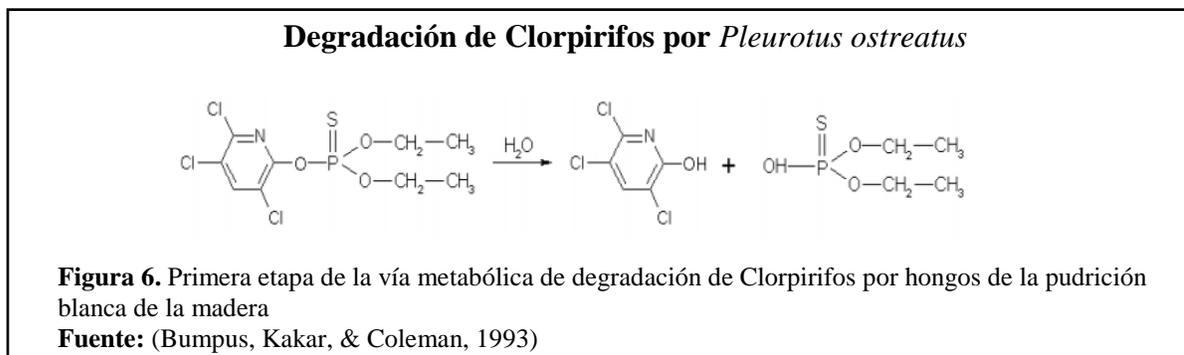
solubles en agua y aumentado su tolerancia a concentraciones de contaminantes relativamente altas.

También posee un sistema intracelular donde se involucra el citocromo P450 monooxigenasa-epoxido hidrolasa. Esta ruta intracelular está presente en todos los organismos eucariotas, donde regula la bioconversión de hormonas y la detoxificación de drogas y xenobióticos (Bernhardt, 2006).

- a) **Características Fisiológicas:** Es un hongo degradador de materia orgánica que se alimenta fundamentalmente de lignina y celulosa. Estos son azúcares que se encuentran disponibles en la materia muerta, por ejemplo la paja, el rastrojo de maíz, caña, trigo, cebada entre otros (López-Rodríguez, Hernández, & Suárez, 2008).
- b) **Características Macroscópicas:** El cuerpo de las setas se constituye principalmente de sombrero (pileo), pie reducido (estípete) y láminas (himenio). El sombrero tiene forma de paraguas, más o menos circular. El tamaño depende de la edad, y oscila entre 5 y 15 cm de diámetro. El color es muy variable: de crema a blanco grisáceo. Presenta un olor muy fuerte, tierno al principio y después correoso. Las láminas se disponen en forma radial como varillas desde el pie o tallo hasta el borde. En estas láminas se producen las esporas. El pie es firme, blanco, algo peludo en la base. Muy corto, algo lateral u oblicuo, ligeramente duro (López-Rodríguez, Hernández, & Suárez, 2008).

- **Modo de acción de *Pleurotus ostreatus* en el insecticida**

Clorpirifos inicialmente es hidrolizado para producir 3, 5, 6 tricloropiimidol (TCP).

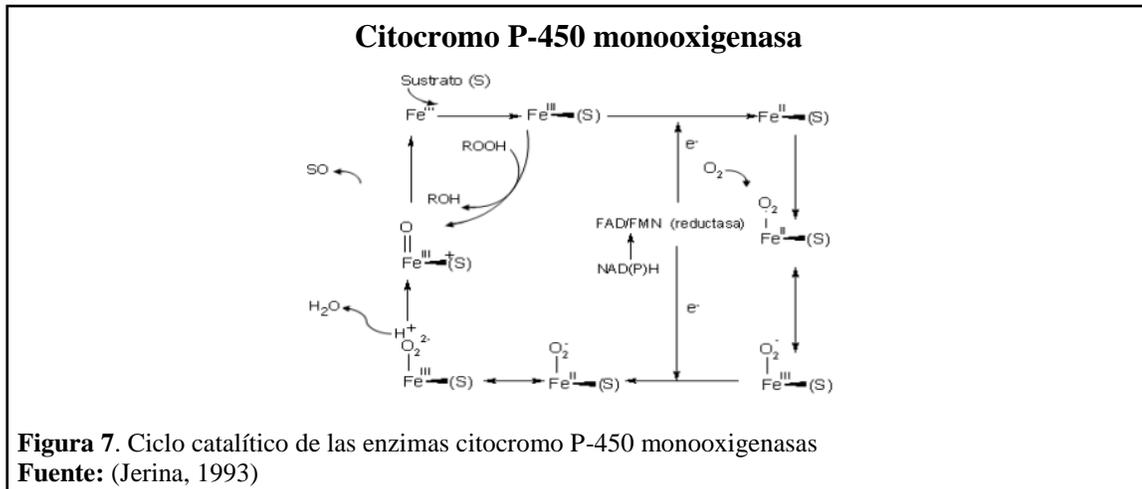


Según (Quintero, 2011) el mecanismo ligninolítico es el menos empleado así como los procesos reductivos, seguido de la oxidación intracelular por las citocromo P-450 monooxigenasas, mecanismo involucrado en la biotransformación de los plaguicidas. Esto se explica por el elevado potencial de ionización que tienen estos agroquímicos.

La degradación de insecticidas por hongos ligninolíticos se suscita en dos fases metabólicas. En la fase I del metabolismo, las enzimas más importantes son las citocromo P-450 monooxigenasas (P-450s) las cuales son una superfamilia de biocatalizadores que introducen un átomo de oxígeno considerando un rango de moléculas más extenso (entre ellas moléculas contaminantes) para producir un epóxido. Estos son inestables y a menudo sufren reacciones de reordenamiento a fenoles o sufren una hidratación enzimática vía otra enzima de la fase I: la epóxido hidrolasa generando trans-dihidrodiolés (Jerina, 1993).

La enzima citocromo P-450 reductasa y su cofactor NADPH intervienen en el transporte de electrones (Jerina, 1993). P-450s son un nombre colectivo dado para todas las hemo-

proteínas que forman un complejo Fe (II)- CO. Se sabe que estas enzimas oxidan más de 200 000 diferentes sustancias químicas exógenas y endógenas (Urlacher & Eiben, 2006).



A diferencia de las peroxidasas, que son oxidoreductasas con el peróxido de hidrógeno actuando como aceptor de electrones, las citocromos P-450 monooxigenasas, rompen el enlace covalente de la molécula de oxígeno (O_2) y un átomo es incorporado a la molécula de sustrato mientras que el otro es reducido a agua (Wood, 1992). Las reacciones globales de los dos sistemas enzimáticos se muestran a continuación (Quintero, 2011):

- **Peroxidasas:** $H_2O_2 + 2R + 2H^+ \rightarrow 2H_2O + 2R^+$
- **Citocromo P-450 monooxigenasas:** $RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2$

La fase I del metabolismo puede actuar como intermediaria para que se lleven a cabo las reacciones de la fase II de carácter reductivo, las cuales son conocidas generalmente como: vías de conjugación. Estas vías son mediadas por la: glutatión-transferasa, sulfotransferasa y glucosyl-transferasa, entre otras; enzimas que adicionan glutatión, sulfato o residuos de azúcar a los xenobióticos, haciéndolos más solubles en agua, menos tóxicos y

más fácilmente eliminables. Posteriormente estos conjugados pueden ser reducidos por las enzimas reductasas (Reddy & Gold, 2000).

La presencia de mecanismos intracelulares de degradación de contaminantes vía reductiva y oxidativa les pueden permitir tolerar mayores concentraciones, y por tanto hacerlos más aptos para procesos de biorremediación en donde los procesos oxidativos extracelulares con las enzimas ligninolíticas sean la característica usada para alcanzar la descontaminación (Quintero, 2011).

CAPÍTULO 2

MARCO METODOLÓGICO

Este capítulo describe la forma en que se llevaron a cabo las fases experimentales: de campo y de laboratorio así como el análisis estadístico de las variables de evaluación. La fase de campo implicó la toma de muestras, la georeferenciación de los sitios de muestreo y ubicación de coordenadas, así como el cálculo de la toxicidad y movilidad del insecticida a través del programa estadístico Csiro Piri Software. La fase de laboratorio abarcó el aislamiento y análisis de resultados tanto de *T. harzianum* como de *P. ostreatus* con el apoyo de laboratorios especializados. El diseño experimental abarcó definición de los tratamientos, el planteamiento de las variables y la toma de datos para su procesamiento. En el análisis estadístico se aplicaron ADEVAS para variables con significancia utilizando Tuckey al 5%.

2.1 Ubicación de sitios de recolección

Se realizó en El Capulí, comunidad perteneciente a la parroquia San Gabriel, cantón Montúfar provincia del Carchi cuyas condiciones ambientales fueron las siguientes (*Ver anexo 1, literal a*):

Humedad:	75.9%
Temperatura:	323.8 °C
Presión:	21.6 ING Hg Bar
Altitud:	2653.89 m.s.n.m.

El segundo sitio de recolección fue en Calacalí ubicado en la provincia de Pichincha (*Ver anexo 1, literal b*).

2.2 Fase de campo

2.2.1 Muestreo: Técnica del Tresbolillo

En El Capulí las muestras de suelo para los análisis de laboratorio fueron tomadas trazando diagonales en forma de zig-zag. Se introdujo el barreno en el suelo girándolo helicoidalmente hasta obtener las muestras. Se llenó un costal con suelo del cultivo de papa para la implementación del ensayo (*Ver anexo 2, literal a-f*).

2.2.2 Georeferenciación

Se georeferenciaron 14 puntos de muestreo empleando un GPS (Grupo de Posicionamiento Global) expresándose la altura en m.s.n.m y las coordenadas referenciales en UTM (Universal Transverse Mercator) (*Ver anexo 3*).

2.2.3 Transporte y almacenamiento

Las muestras de suelo fueron colocadas en fundas ziploc de 1 kg, etiquetadas y transportadas en un cooler hasta los laboratorios de la UPS en Cayambe y Quito. El costal de suelo fue almacenado bajo condiciones de temperatura y humedad ambiente.

En el sector de Calacalí, provincia de Pichincha, se recolectaron los hongos Basidiomicetos. Las muestras fueron colocadas en fundas ziploc de 1 kg, etiquetadas con los datos del sector y transportadas en un cooler (*Ver anexo2, literal d-e*).

2.2.4 Csiro Piri Software

El PIRI conocido en inglés como *Pesticide Impact Index Rating* es una herramienta que permite evaluar la peligrosidad del uso de plaguicidas en términos del potencial impacto

sobre la calidad de aguas superficiales o subterráneas y la salud del ecosistema. Este índice clasifica la movilidad y toxicidad de los plaguicidas dentro de una escala cualitativa: extremadamente alto, muy alto, alto, bajo y muy bajo. Está basado en el modelo AF (Análisis Factorial) donde se consideran datos como: textura, cobertura, materia orgánica, período del ciclo del cultivo, precipitación, temperatura, estimación de erosión, y datos fisicoquímicos y de comportamiento ambiental del plaguicida, entre otros (Aguilar, Chin, & Ruíz, 2014).

La información obtenida sobre el cultivo de papa en el Sector de El Capulí fue ingresada en este programa en el cual se calculó el riesgo de impacto de movilidad y toxicidad del insecticida Clorpirifos en agua superficiales y aguas subterráneas. Se obtuvo como resultado un valor porcentual y una categorización en función de una barra colorimétrica. Una vez obtenidas las barras es necesario analizar su relación con la información primaria obtenida en campo (*Ver Anexo 4*).

2.2.5 Construcción del terrario climatizado

Se elaboró con vidrio de cuatro líneas con las siguientes dimensiones: largo de 100 cm, ancho de 100 cm, alto de 49 cm y una tapa de 100 x 100 cm.

Se utilizaron 4 vidrios de 49 x 100 cm y dos vidrios de 100 x 100 cm para la base y la tapa del terrario. Las aristas fueron pegadas con silicona a prueba de agua dejándose secar por 5 horas y reforzándose las esquinas con maskin evitando posteriores fugas de agua. Dentro del terrario se colocaron 4 vidrios pequeños de 5 x 12 cm: dos en el centro de la caja y dos en los laterales. Estos fueron sujetos con silicona. Las rejillas de plástico cuadradas

fueron colocadas sobre estos vidrios pequeños dentro del terrario. Encima de estas se colocó una tina con agua, el humidificador y el vaporizador. Las toallas de microfibra se colocaron desde el recipiente con agua pasando por los orificios de las rejillas a fin de que se mantenga la humedad del terrario.

Los hongos colectados fueron colocados en un sustrato a base de aserrín y maleza dentro de una funda plástica y otros en bandejas de aluminio. Una vez colocados los hongos, se instaló la lámpara led encima de la cámara proporcionando luz cada 12 horas (*Ver anexo 5, literal a-d*).

2.2.6 Inoculación del insecticida en suelo

Sobre funda plástica negra se colocó el suelo colectado en un costal, el cual fue removido con ayuda de una pala hasta su homogenización (*Ver anexo 6, literal a-b*). Se aplicó un total de 500 mL del producto comercial al 48% de concentración, distribuidos en 8 aplicaciones con diferentes dosis. El insecticida fue colocado en un recipiente con agua dependiendo de la dosis a aplicar. Se inoculó y se mezcló homogéneamente. Luego, el suelo fue cubierto con plástico negro evitando así la evaporización del insecticida (*Ver anexo 6, literal b-d*).

2.2.7 Diseño experimental

Unidades experimentales: 16

Tratamientos: 4

Repeticiones: 4

Tabla 5. Tratamientos del ensayo experimental

Tratamiento	Especificación
T0	Muestra del suelo con insecticida sin hongo
T1	Muestra de suelo con insecticida más <i>Pleurotus ostreatus</i>
T2	Muestra de suelo con insecticida más <i>Trichoderma harzianum</i>
T3	Muestra de suelo con insecticida más <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>

Elaborado por: La autora, 2017.

2.2.8 Implementación del ensayo

Se emplearon 20 cajas de cartón forradas con plástico negro con un tamaño de 18 x 27 x 10 cm. En cada caja se colocó 1 kg de suelo con insecticida (*Ver anexo 7, literal a-d*).

2.2.9 Variables en estudio

En campo:

- **Temperatura y humedad:** Se tomaron los datos cada 12 horas con un termohidrómetro; la primera a las 6:30 am y la segunda a las 7:00 pm de la noche. Se consideró la temperatura y la humedad del centro de la caja expresada en grados centígrados (°C) y en porcentaje (%), respectivamente. Una vez colectados los datos se procedió a ingresarlos en el Software Estadístico InfoStat considerando los valores promedio cada 15 días.
- **pH:** En cada tratamiento, se tomó 10 gramos de suelo y se diluyó en aproximadamente 30 mL agitándose y luego introduciéndose en estas las bandas de papel indicadoras de pH. Se procedió a su medición comparando el resultado con el rango colorimétrico descrito en la caja. Una vez colectados los datos se procedió a ingresarlos en el Software Estadístico InfoStat considerando los valores promedio cada 15 días en cada inoculación.

En laboratorio:

- **Determinación de la concentración de insecticida por GC/MS:** Se analizó el suelo en tres momentos diferentes: el primero después del muestreo analizado por el método de Quechers; el segundo después de la aplicación del insecticida y el tercero luego de la inoculación de los hongos analizados por Cromatografía de gases aplicado a masas (GC/MS) expresándose los resultados en ppm. Se consideró la concentración inicial del insecticida en el suelo y luego se realizó una diferencia con la concentración de insecticida final obteniéndose el dato de la cantidad removida. Esto permitió determinar cuál tratamiento fue el mejor durante la fase de experimentación. Los análisis se realizaron a través del ADEVA con una prueba de Tuckey al 5%.

2.3 Fase de laboratorio

2.3.1 Análisis físico-químico del suelo

Al inicio y al final del ensayo experimental se analizaron los siguientes parámetros: textura del suelo, cantidad de materia orgánica, concentración de macro y micronutrientes, pH, conductividad eléctrica (C.E.), nitrógeno total, relaciones entre elementos: Fe/Mn, Ca/Mg, Mg/K, Ca+ Mg/ K y textura.

Se analizaron en el Laboratorio de Suelos y Agua de la Universidad Politécnica Salesiana ubicado en Cayambe mediante métodos de análisis estandarizados como: Método Olsen Modificado (*Ver anexo 8, literal a-b*) para nutrientes asimilables: P, K, Ca, Mg, Na, Fe,

Mn, Cu y Zn; y acetato de amonio para nutrientes intercambiables: Ca, Mg, K, Na (*Ver Anexo 9*).

2.3.2 Análisis por Cromatografía de Gases aplicado a masas (GC/MS)

En el Laboratorio de Aplicaciones Nucleares del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable se realizaron los análisis por: Método de Quechers para determinación de trazas y por Cromatografía de Gases acoplado a masas (CG/MS) para determinar la presencia y la cantidad de IOP presentes en el suelo y en el agua. Para la extracción de las muestras de suelo se empleó el Método de Quechers el cual permite determinar residuos de plaguicidas.

- **Método de QUECHERS:** Este método consistió en pesar 10 g de muestra de suelo en un tubo de centrífuga de 50 mL. Se añadió un volumen de la disolución del IS (Estándar Interno). Después de 2 min, se añadieron 20 mL de ACN (acetonitrilo) y se agitó vigorosamente por 1 min. Luego, se añadieron 4 g de Mg SO₄ · H₂O, 1 g de NaCl de citrato trisódico dihidratado y 0.5 g de citrato disódico sesquihidratado. La muestra fue agitada una vez más por 10 s. Se introdujo en un baño maría de ultrasonido durante 5 min, y finalmente, se centrifugó a 3000 rpm por 8 min. Posteriormente, se llevó a cabo una etapa de limpieza mediante dSPE (Extracción en Fase Sólida Dispersa) añadiendo 10 mL el sobrenadante en un tubo de centrífuga de 15 mL con 1.5 g de MgSO₄ · H₂O y 0.250 g de PSA. Se agitó durante unos segundos y se sometió a ultrasonidos durante 1 min. Luego, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se evaporó el sobrenadante a 40 °C y 200

mbar en rotavapor hasta la sequedad. El residuo se disolvió en 1 ml de ciclohexano y tras añadir una pequeña cantidad de Na₂SO₄ anhidro. La solución se filtró a través de membrana de 0,20 µm de PET (LMEER, 2017) (*Ver Anexo 10, literal a-f*).

- **Método por Cromatografía (GC/MS):** De cada uno de los 16 tratamientos se pesaron 5 g en un vial. A esta se añadieron 15 g de sulfato de sodio anhidro y, se agitó y se dejó por 30 min en reposo. Luego, se agregó 10 mL de iso-octano. El tubo fue agitado por 2 min, sonificado por 10 min y centrifugado por 5 min a 3000 rpm. Una vez retirado el sobrenadante a un vial de 20 mL (cada uno de los viales fue pesado), se colocaron 10 mL más de iso-octano y se repitió el procedimiento hasta el traspaso del sobrenadante al mismo vial de 20 mL. Finalmente, se pesó el vial con el volumen de los dos sobrenadantes. A partir de estos tubos, y por cada una de las muestras, se tomaron 50 µl y fueron llevados a 1 mL por tres veces en viales de 2 mL. Los viales de las terceras diluciones fueron llevados al CG/MS para su análisis (LMEER, 2017) (*Ver Anexo 11, literal a-e*).

2.3.3 Preparación de medios de cultivo

En un frasco boeco de 1000 mL se suspendió 39 g de polvo Potato Dextrose Agar (PDA) y para el medio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 65 g, en 1 L de agua purificada calentando la solución y homogenizando con un agitador durante 40 min. Después de llevar al autoclave se añadió 1.5 mL de gentamicina y 1.8 mL de ácido tartárico al 10%. Finalmente, se dispensó (Diagnostics, 2009).

2.3.4 Diluciones seriadas

Se colocaron 10g de suelo en un frasco boeco de 100 mL. Luego se añadieron 90 mL de agua destilada y se agregó 1 g de NaCl agitándose vigorosamente el frasco en forma de ocho por cinco veces. Se tomaron seis tubos y en cada uno se colocó 9 mL de agua destilada. En el tubo 1, se colocó 1 mL de la solución de madre (suelo+ agua+ NaCl) y se agitó vigorosamente. Posteriormente, de este tubo se tomó 1 mL y se colocó en el tubo 2 repitiéndose el procedimiento hasta la dilución de 10^{-6} (*Ver anexo 12, literal a-d*).

2.3.5 Siembras en Placa Pobre de *Trichoderma harzianum*

En seis cajas Petri se colocó 1 mL de la disolución 10^{-1} y 15 mL de medio de cultivo. Se realizaron movimientos en forma de cruz cinco veces seguidas. Las cajas fueron selladas con parafilm y colocadas en una incubadora a 25 °C por 15 días. El procedimiento se repitió con las siguientes diluciones: de 10^{-2} a 10^{-6} en medio PDA y medio SDA bajo las mismas condiciones (*Ver anexo 12, literal e*).

2.3.6 Identificación macroscópica de *Trichoderma harzianum*

Se observó la coloración del medio de cultivo, la forma de crecimiento de los hongos y el tamaño del micelio por el envés y haz de la caja. Este procedimiento se realizó de la misma manera para *Pleurotus ostreatus*.

2.3.7 Microcultivo de *Trichoderma harzianum*

Dentro una caja Petri se colocaron dos porta objetos uno sobre otro a manera de cruz manipulándolos con pinzas metálicas estériles para su manipulación. A partir de un medio

PDA, se cortaron dos cuadrados de 1 x 1 cm los cuales fueron colocados encima de los portaobjetos. A su vez el hongo fue tomado y sembrado con una aza estéril en las esquinas de cada uno de los cuadrados y posteriormente, se añadieron 5 mL de agua destilada estéril dentro de la caja Petri creando un microclima. Las cajas fueron selladas y colocadas en una incubadora a 25°C por dos semanas (González, 1999).

2.3.8 Identificación microscópica de *Trichoderma harzianum*

Fue empleada la Técnica de la Cinta Adhesiva. Se tomó un trozo de cinta y se colocó encima de la superficie cultivo. La cinta fue colocada sobre un portaobjetos limpio y se añadió una gota de lactofenol con el fin de tinturar y mejorar la observación de las estructuras del hongo. Se observó la placa en un microscopio electrónico con los lentes: 4X, 10 X y 40 X. Para el lente de 100X se empleó una gota de aceite de inmersión sobre la placa. Se procedió a observar e identificar el hongo atendiendo a claves taxonómicas de Barnett. Este procedimiento se ejecutó de la misma manera con *Pleurotus ostreatus*.

2.3.9 Conservación *Trichoderma harzianum*

La conservación se realizó de dos maneras: en glicerina y agua destilada estéril. En la primera se tomaron 10 tubos eppendorf a los cuales se agregó 1 mL de glicerina diluida al 10%. Se tomó una muestra de *Trichoderma harzianum* de una de las cajas y se introdujo en el tubo eppendorf. Este procedimiento fue realizado con los nueve tubos restantes. Cada uno fue agitado en un vórtex por tres minutos, etiquetados y colocados en refrigeración a 2°C.

La otra forma de conservación consistió en tomar 4 tubos eppendorf en los cuales se agregó 1 mL de agua destilada con una muestra de *Trichoderma harzianum*. Cada uno de los tubos se agitó por tres minutos (Gato, 2010). Estos tubos fueron etiquetados y colocados en refrigeración a 2 °C como en la primera forma.

2.3.10 Crioconservación de *Trichoderma harzianum*

En crioviales de 1.5 mL se colocó una muestra de *Trichoderma harzianum*. Posteriormente, se retiró el solvente y quedaron las perlas con el hongo adherido a estas (Gato, 2010). Se etiquetaron y fueron guardadas a -80 °C.

2.3.11 Preparación de la solución y conteo de UFC/mL

En un tubo de ensayo se colocó 10 mL de suero fisiológico diluido con Tween 80 al 1%. Se agitó vigorosamente y posteriormente se colocaron las esporas de *Trichoderma harzianum* en esta solución (Ver anexo 13, literal a-c).

En el caso de *Pleurotus ostreatus* se cortó el medio con el hongo en cuadraditos y se colocó en otro tubo de ensayo con la solución mencionada. Se agitó vigorosamente pero en este caso se filtró la solución.

Se tomaron 50 µL de la solución y se colocaron en la cámara de Neubauer en los campos de conteo evitando la formación de burbujas con ayuda de una micropipeta. Por medio de fórmulas se pudo obtener el número de esporas por mL (Ver anexo 13, literal d-e).

(Gilchrist, y otros, 2005) determinando así la concentración de esporas a inocular (*Ver anexo 13, literal f-g*).

$$\text{Concentración (cel/mL)} = \frac{\text{Total de células contadas} \times 250\,000}{\text{No. de cuadrados}}$$

(Celeromics, s.f.)

2.3.12 Siembra de *Pleurotus ostreatus*

Las siembras del micelio se realizaron en medio PDA cortando cuadrados de 1.5x 1 cm y colocándolos sobre el medio en la caja Petri. Las siembras se dejaron en incubación a 25°C por 15 días (*Ver anexo 14, literal a-b*).

2.1.13 Resiembra de *Pleurotus ostreatus*

A partir de una caja con crecimiento de micelio de *Pleurotus ostreatus*, se tomó un trozo de medio de 1 x 1 cm con el hongo y se colocó dentro de una caja Petri preparada y autoclavada; se selló la caja con parafilm y se incubó a 25°C por dos semanas (*Ver anexo 14, literal c-d*).

2.1.14 Preparación y aplicación del inóculo

Se tomaron 22 cajas de siembra con *Trichoderma harzianum* y 20 cajas con *Pleurotus ostreatus*. En cada caso los medios de cultivo de las cajas fueron cortados en cuadraditos y depositados en el interior de un recipiente de plástico con agua tibia. Estos envases fueron cerrados y agitados vigorosamente (*Ver anexo 15, literal a-b*). Se realizó la inoculación de 125-130 mL de cada hongo considerando los tratamientos y las repeticiones (*Ver anexo 15, literal c*).

2.4 Análisis Estadístico

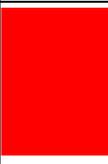
Se llevó a cabo con la información colectada entre el día 1 y el día 53 sobre las variables con significancia dentro del ensayo: temperatura, humedad, pH y a la concentración del insecticida removido. Estos datos fueron ingresados en el Software Estadístico InfoStat en el cual se aplicaron ADEVAS con pruebas de Tuckey al 5%.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Impacto en la movilidad y toxicidad de Clorpirifos

Tabla 6. Impacto de la movilidad y toxicidad de Clorpirifos

Insecticida	Movilidad (%)	Categorización	Color	Toxicidad (%)	Categorización	Color
Clorpirifos en aguas Subterráneas	4.8×10^{-9}	Muy Bajo		2.4×10^4	Medio	
Clorpirifos en Aguas Superficiales	0.013	Bajo		0.645	Alto	

Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

En la Tabla 6, se observan los datos obtenidos del cálculo del impacto en la movilidad y en la toxicidad del insecticida Clorpirifos tanto en aguas superficiales como subterráneas después de ingresarse la información referente al sector muestreado, en el Programa Estadístico Csiro Piri Software. A partir de estos datos se evaluó el impacto que tiene el insecticida organofosforado en el suelo y el cultivo ya que son aguas que se relacionan directamente con este recurso y los productos que vienen de él como la papa, produciéndose disminución de la biodiversidad microbiana del suelo, pérdida de fertilidad y de materia orgánica, además de la acumulación de estos en el interior del tubérculo (Del Puerto, Suárez, & Palacio, 2014).

En las primeras tres columnas al lado izquierdo se observan los datos referentes a la movilidad del insecticida tanto en aguas superficiales como en aguas subterráneas. La movilidad de Clorpirifos se relaciona con factores agroclimáticos, como la textura del suelo: franco arenoso, la temperatura promedio mínima y máxima (8 a 21°C), la pluviosidad dentro del período de interés (168 mm), la cantidad de materia orgánica (2.50%), la disociación del insecticida (0) considerando su persistencia, degradación y estabilidad, datos proporcionados por el Piri.

El cálculo de la movilidad por Csiro Piri Software depende de la naturaleza química de los insecticidas. En aguas superficiales como en aguas subterráneas la movilidad de Clorpirifos es baja: 0.013% y muy baja: 4.8×10^{-9} %, respectivamente. Considerando los datos más relevantes del programa en relación a Clorpirifos, y a otro organofosforado para su comparación como Fenamifos que es menos persistente que Clorpirifos con 2 y 216 días, respectivamente. El K_d (*constante de disociación*), el K_{oc} (*coeficiente de adsorción*), la escorrentía y la capa de erosión son datos calculados por el Csiro Piri Software y es información relacionada con la persistencia del insecticida en el suelo y el potencial de contaminación expresado en kg/ha influenciado por la acción de las aguas superficiales y subterráneas en suelo. Estos valores de persistencia se relacionan con el valor K_d donde para Fenamifos es de 10.95930 y para Clorpirifos 118.47384. Por lo tanto, Clorpirifos tiende a retenerse y persistir en las partículas del suelo más que el otro insecticida organofosforado y por ende, este último se lixiviará más que el insecticida objeto de estudio (*Ver anexo 16, literal a y b*).

Fenamifos presenta una movilidad en aguas subterráneas considerada baja: 4.0×10^{-8} % pero es mayor a la calculada para Clorpirifos: 4.8×10^{-9} %. En aguas superficiales la movilidad de Fenamifos, categorizada como media: 0.328 % es mayor a la obtenida para Clorpirifos: 0.013%. El Koc (*coeficiente de adsorción*) para Clorpirifos es de 8151 mL/g interpretándose como un insecticida no móvil y por lo tanto, no lixiviable. La escorrentía (mm) obtenida para ambos insecticidas es la misma: 5.18553 mm. Sin embargo, la capa de erosión del suelo en Clorpirifos es mayor: 0.003 que en Fenamifos: 0.00005 (*Ver anexo 16, literal a y b*).

Según (University of Hertfordshire, 2016) en la base de datos PPDB (*Pesticides Properties DataBase*) el insecticida organofosforado Clorpirifos es poco soluble en agua a 20 °C comprobándose que la movilidad del insecticida, considerando la temperatura máxima del sector que es de 21 °C, es baja: 1.05 mg/L. Al ser un insecticida de naturaleza liposoluble (Brom, 2014) no se diluye fácilmente en agua; sin embargo, frente a solventes orgánicos si lo hace. Algunos ejemplos son: el hexano (774 000 mg/L), metanol (290 000 mg/L) y el acetato de etilo (4 000 000 mg/L) logra diluirse debido a su naturaleza no polar. La lixiviación de un insecticida está relacionada con el Índice GUS (*Groundwater Ubiquity Score* o índice potencial de lixiviación), el LP (*potencial de lixiviación*) y el Koc (*índice de adsorción al suelo*). Según (Frazar, 2000) cuando el valor de GUS es mayor a 2.8 el insecticida es lixiviable; cuando va de 1.8 a 2.8 se encuentra en transición y cuando es menor a 1.8 se considera como un insecticida no lixiviable. En el caso de Clorpirifos su Índice GUS es de 0.17; es decir, no lixiviable. El LP (valor adimensional) para este insecticida es de 0.003 considerado por la USEPA como no lixiviable o NL. El Koc representa la capacidad del insecticida para quedar retenido por la materia orgánica y la

arcilla del suelo. Si el valor de Koc es menor o igual a 512mL/g se trata de un insecticida lixiviable, pero si es mayor a 512mL/g se considera no lixiviable y por lo tanto con el valor obtenido se comprueba que Clorpirifos no se lixivia.

El problema de la erosión, considerado como el material afectado de la superficie terrestre por acción del agua superficial, no sólo está relacionada al uso de insecticidas sino también a la pérdida de fertilidad, la reducción de la microbiota y la materia orgánica (Badii & Varela, 2007). Según (Silva & Correa, 2009) la erosión superficial puede transportar insecticidas a los sistemas acuáticos. En el sector de El Capulí la fuente más cercana se ubica a 13 m de distancia del cultivo y se ve afectado por las aguas superficiales. A pesar de que el sector de El Capulí entre el mes de abril y mayo, meses de interés del proyecto, presentaron una pluviosidad de 168 mm de los 892 mm registrados en el 2016 (ClimateData, 2016), lo que indica que la lixiviación de este insecticida hacia la zona freática es muy baja corroborando los resultados obtenidos en cuanto a movilidad (*Ver anexo 16, literal a-b*).

En las tres columnas del lado derecho de la Tabla 6 se encuentran los valores referentes a la toxicidad de Clorpirifos. En aguas superficiales es alta: 0.645% y en aguas subterráneas es media: 2.4×10^4 %. Considerando el ejemplo del Fenamifos, este es más tóxico que Clorpirifos. En aguas subterráneas es 0.02% y Clorpirifos: 2.4×10^4 %. Lo mismo ocurre en aguas superficiales donde Fenamifos presenta 164083×10^{-5} % un porcentaje mayor al de Clorpirifos con 0.645%. Por lo tanto, la toxicidad del insecticida depende del ingrediente activo que lo conforma. Para la salud humana el Health Advisory Limits (USEPA, 2015) calculado tanto para aguas superficiales como para aguas subterráneas es de 0.02 mg/L y

para Fenamifos 0.002 mg/L por lo cual su incidencia en la salud humana es mayor (*Ver anexo 16, literal c-d*). La contaminación por Clorpirifos sobre los cuerpos de agua cercanos al cultivo de papa incide directamente en ellos.

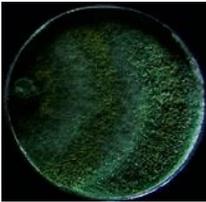
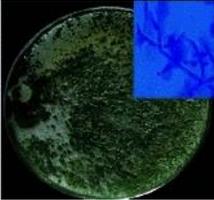
La acumulación de estos agroquímicos en los tubérculos de la papa se ha comprobado con el análisis realizado en el Centro de Soluciones Analíticas Integrales (CENTRO CESAL Cía. Ltda) dando como resultado una concentración de 0.82 µg/kg, concentración que es alta comparado con otros insecticidas organofosforados también identificados, como: monocrotofos, profenofos, metamidofos, malatión, dimetoato, diazinon, etil-paratión y acefato cuya concentración es menor a los 0,02 µg/kg (*Ver anexo 17, literal a*). Las concentraciones de los insecticidas analizados dependen de los picos, el área y el QIon analizado (*Ver anexo 17, literal b-c*).

Según un estudio realizado por (Benítez-Díaz, Miranda-Contreras, Molina-Morales, Sánchez-Gil, & Balza-Quintero, 2015) sobre los residuos de plaguicidas en la cáscara e interior de la papa indica que Clorpirifos aparece junto a otros tres IOP's en la cáscara de la papa: diazinon, dimetoato, metamidofos; y en el interior de la papa se encuentran tres IOP's: Clorpirifos, diazinon, metamidofos. La frecuencia de detección de los insecticidas mencionados es mayor en la cáscara que en la parte interna del tubérculo, para Clorpirifos 56% y 37.5%, respectivamente. En los otros insecticidas los valores son parecidos como por ejemplo el Diazinon con 62.5% en cáscara y 31.1% en el interior de la papa. Sólo Metamidofos se encuentra en mayor proporción en el interior del tubérculo: 81.3% que en la cáscara: 75%. Por lo tanto, la cáscara de la papa también juega un papel importante en la retención de los insecticidas. El problema radica no sólo a nivel ambiental. El Carchi es

la primera provincia papicultora y abarca el 32% de la producción nacional; sin embargo, el peligro del uso de los insecticidas no sólo abarca temas ambientales sino también problemas de salud, ya sea por ingestión, inhalación o por contacto (LORSBAN, 2017).

3.2 Identificación macroscópica y microscópica de *Trichoderma harzianum*

Tabla 7. Identificación Macroscópica *Trichoderma harzianum*

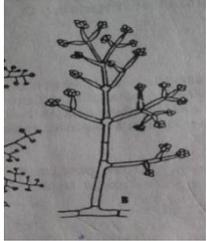
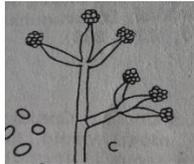
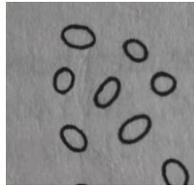
Lado de la caja petri		Identificación Macroscópica	Identificación Bibliográfica
Haz de la caja	Formación de micelio en la superficie de medio PDA	 <p>Fuente: La autora, 2016.</p>	 <p>Fuente: (Mukherjee, Sampath, Kranthi, & Mukherjee, 2014)</p>
	Coloración del micelio	 <p>Fuente: La autora, 2016.</p>	 <p>Fuente: (Mukherjee, Sampath, Kranthi, & Mukherjee, 2014)</p>

Nota: Elaborado por: La autora, 2017.

En la Tabla 7, en la columna izquierda se observa la formación del micelio de *Trichoderma harzianum*. Este cubre la superficie del medio de cultivo con un crecimiento que alcanza los 9 cm de diámetro y de 1 a 1.5 mm de altura. El micelio observado es de color verde oscuro y de aspecto polvoriento. Este hongo presenta una coloración entre blanco y verde pálido al inicio de su formación. Entre el cuarto y séptimo día comienza a cambiar su coloración a verde oscuro. En el envés de la caja se torna de una coloración

amarillenta (*Ver anexo 18, literal a-d*). En la columna derecha se observa el crecimiento de *Trichoderma harzianum*. Según (Mukherjee, Sampath, Kranthi, & Mukherjee, 2014) y (Cholango, 2009) *Trichoderma harzianum* posee colonias de rápido crecimiento en PDA, con un diámetro que va de 7 a 9 cm después de 3 días de incubación. El micelio aéreo flucoso, blanco a ligeramente gris o raramente amarillo, conidiación que cubre con frecuencia toda la superficie de la placa que produce pústulas aplanadas hasta de 8 mm en diámetro, concéntricas o cerca de las márgenes de la placa, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril. Al reverso colonias incoloras o amarillas, pardas, ocráceas. Esta descripción concuerda con lo observado en laboratorio. Se comprueba que el género corresponde al hongo en estudio.

Tabla 8. Identificación Microscópica de *Trichoderma harzianum*

Estructuras	Identificación microscópica Lente (40X)	Claves Taxonómicas
Conidióforos	 <p data-bbox="500 598 771 630">Fuente: La autora, 2016.</p>	 <p data-bbox="813 598 1068 630">Fuente: (Barnett, 1960)</p>
Fiálides	 <p data-bbox="500 846 771 877">Fuente: La autora, 2016.</p>	 <p data-bbox="813 846 1068 877">Fuente: (Barnett, 1960)</p>
Conidios	 <p data-bbox="500 1092 771 1123">Fuente: La autora, 2016.</p>	 <p data-bbox="813 1092 1068 1123">Fuente: (Barnett, 1960)</p>

Nota: Elaborado por: La autora, 2016.

En la Tabla 8, en la columna izquierda se observan los conidióforos, las fiálides y los conidios. Estas tres estructuras presentan una coloración verdosa. Los conidióforos se muestran largos y ramificados a manera de árbol. Las fiálides son delgadas y se desprenden de los conidióforos. Estas presentan un ensanchamiento en la parte central; sin embargo en el ápice se tornan delgadas. Los conidios son redondos u ovalados, se los puede encontrar solos o agrupados como un racimo de uvas al final de las fiálides con un diámetro aproximado de 0.5 mm. En la columna derecha se observan las claves taxonómicas de (Barnett, 1960) empleadas para su identificación. Estas también se pueden comprobar con la descripción realizada por (Romero, Huerta, Huato, Domínguez, &

Arellano, 2009), los conidioforos son de color verde muy ramificados y dispuestos de forma perpendicular. En ocasiones se observan ramas laterales en pares o en grupos de tres. Las fiálides son largas, delgadas, asimétricas y con verticilos terminales. Los conidios presentan forma subglobosa. Estas características descritas guardan relación con las observadas en laboratorio.

3.4 Identificación macroscópica y microscópica de *Pleurotus ostreatus*

Tabla 9. Identificación Macroscópica de *Pleurotus ostreatus*

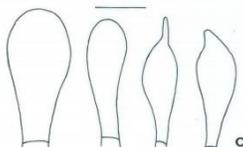
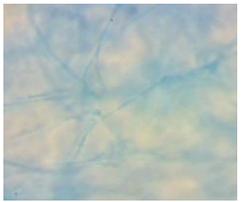
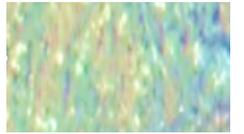
Lado de la caja petri	Identificación macroscópica	Referencia bibliográfica
Haz de la caja	<p>Formación de micelio en la superficie de medio PDA</p>  <p>Fuente: Maldonado, 2016.</p>	 <p>Fuente: (Suárez, 2010)</p>
	<p>Coloración del micelio</p>  <p>Fuente: Maldonado, 2016.</p>	 <p>Fuente: (Suárez, 2010)</p>

Nota: Elaborado por: La autora, 2016.

En la Tabla 9, en la columna izquierda se observa la formación del micelio en forma radial e invasivo a partir del punto de siembra. El diámetro mínimo de crecimiento es de 4.0 cm y el máximo es de 9.0 cm. El micelio llega a cubrir el medio de cultivo en su totalidad. Este hongo presenta una textura algodonosa y blanca. Una vez que el micelio ha madurado, exuda sustancias de color amarillo fuerte y aceitoso.

En la columna derecha se observa la descripción realizada por (Suárez, 2010) donde se describe el crecimiento en PDA a 22°C del micelio blanquecino formando halos de aspecto algodonoso, liso, no esporulento, de forma circular y alrededor del punto de siembra. Abarca completamente la caja Petri al cabo de 14 días de inoculación. Una vez maduro genera sustancias aceitosas y blanquecina que indican el grado de madurez del hongo y por tanto la viabilidad de las esporas (*Ver anexo 19, literal a-b*). El micelio obtenido una vez maduro, Estas características concuerdan con las observaciones realizadas en laboratorio.

Tabla 10. Identificación Microscópica de *Pleurotus ostreatus*

Estructuras	Identificación Microscópica Lente (100X)	Claves taxonómicas
Basidióforos (Cheilocystidia)	 <p>Fuente: La autora, 2016.</p>	 <p>Fuente: (Menolli, Asai, Capelari, & Paccola-Meirelles, 2010)</p>
Basidios	 <p>Fuente: La autora, 2016.</p>	 <p>Fuente: (Menolli, Asai, Capelari, & Paccola-Meirelles, 2010)</p>
Basidioesporas	 <p>Fuente: La autora, 2016.</p>	 <p>Fuente: (Menolli, Asai, Capelari, & Paccola-Meirelles, 2010)</p>

Nota: Elaborado por: La autora, 2016.

En la Tabla 10, en la columna izquierda se observa la formación de tres estructuras: basidióforos alargados, delgados con terminaciones en punta. Los basidios se encuentran entrelazados a manera de una red y albergan en sus terminaciones a los basidiosporas.

Finalmente, las basidiosporas son cilíndricas, delgadas y se encuentran agrupadas. Según (Menolli, Asai, Capelari, & Paccola-Meirrelles, 2010) los basidióforos son alargados y en ocasiones subclavados, los basidios clavados entrelazados a manera de red y las basidiosporas cilíndricas con paredes cilíndricas, paredes delgadas, hialinas, lisas e inamiloides. Esta descripción concuerda con las imágenes del lado derecho de la tabla.

3.5 Análisis Estadístico de las variables del ensayo

3.5.1 Temperatura

Tabla 11. Promedios de InfoStat: Temperatura, ranqueo, C.V y significancia

Tratamiento	Temperatura Promedio (°C)	Ranqueo	C.V. (%)	<i>p</i> -valor (%)	Significancia
T2	24.20	A	0.17	0.01	**
T3	24.05	B			
T1	24.05	B			
T0	23.90	C			

Nota: Elaborado por: La autora, 2017.

Fuente: (InfoStat, 2015)

C.V.: Coeficiente de variación

“***”: Altamente significativo

En la Tabla 11, se indica que el C.V. promedio del ensayo es de 0.17% mismo que se encuentra dentro de los valores establecidos para este tipo de ensayos. El T2 presenta la mayor temperatura del proceso con 24.20 °C, seguido por el T3 y el T1 con 24.05 °C, y finalmente el T0 con 23.90 °C. La prueba de Tuckey al 5%, indica que los datos obtenidos están dentro de un ranqueo categorizado como “A” al T2, “B” al T3 y T1, y finalmente

“C” al T0; es decir los datos obtenidos son estadísticamente diferentes y altamente significativos.

Las temperaturas registradas en el ensayo son similares posiblemente por el manejo que se dio a los tratamientos. Este factor es importante en la biodegradación del insecticida porque acelera el metabolismo y velocidad de reacción de los procesos metabólicos.

Las temperaturas promedio obtenidas del T0 al T3 se encuentran dentro del parámetro establecido por (Vásquez, 2010): de 10 °C a 40 °C para que se degrade la molécula química de Clorpirifos. Para ello se necesitan de procesos hidrolíticos en los cuales las enzimas transferasas permitan la adhesión o la ruptura de la molécula absorbiendo o liberando energía en el proceso (Inchem, 1972).

Según (Gebremariam, Beutel, Yonge, Flury, & Harsh, 2012) tanto los procesos bióticos como los abióticos contribuyen a la degradación de Clorpirifos. La degradación en el T0 posiblemente estuvo influenciado por factores externos como la luz, la temperatura ambiental y la carga microbiana autóctona del lugar.

Los valores obtenidos de *p-valor* de 0.01% dan una pauta para tomar una decisión sobre la aceptación o rechazo de la hipótesis (Fernández S. & Díaz S., 2001). Al ser un proceso altamente significativo, se acepta la hipótesis alternativa: la biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa es posible mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.

3.5.2 Humedad

Tabla 12. Promedios de InfoStat: Humedad, ranqueo, C.V y significancia

Tratamiento	Humedad Promedio (%)	Ranqueo	C.V. (%)	p-valor (%)	Significancia
T0	49.83	A	0.26	0.01	**
T1	48.58	B			
T3	47.65	C			
T2	47.60	C			

Nota: Elaborado por: La autora, 2017.

Fuente: (InfoStat, 2015)

“**”: Altamente significativo

En la Tabla 12, se indica que el C.V. promedio del ensayo es de 0.26% lo cual permite considerar la confiabilidad de la información. El T0 presenta la mayor humedad del proceso con 49.83%, seguido de T1 con 48.58%, T3 con 47.65% y finalmente T2 con 47.60%. La prueba de Tuckey al 5%, indica que los datos obtenidos están dentro de un ranqueo categorizado como “A” para el T0, “B” para T1, y finalmente “C” para el T2 y el T3, es decir, son estadísticamente diferentes y altamente significativos.

Los datos de la humedad reflejan que la cantidad de agua añadida ya sea directamente o en forma de inóculo fue igual en los ensayos; sin embargo, la variación radicó en la influencia de los hongos en esta variable. A pesar de ello, los datos obtenidos en el presente ensayo están dentro del rango establecido por (Vásquez, 2010) considerando las condiciones de hongos como *Trichoderma* spp. y *Pleurotus ostreatus*: el porcentaje óptimo de humedad se encuentra entre 20-90%.

En este caso al tratarse de un suelo con *Pleurotus ostreatus* se considera el ciclo metabólico del P-450 monooxigenasas. Estas enzimas rompen el enlace covalente de la molécula de oxígeno y un átomo es incorporado a la molécula de sustrato mientras el otro

es reducido a agua en la segunda fase del metabolismo, se desprende una molécula de agua por acción (Wood, 1992).

El valor obtenido del *p-valor* de 0.01% indica que, el ensayo al ser un proceso altamente significativo, se acepta la hipótesis alternativa: la biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa es posible mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.

3.5.3 pH

Tabla 13. Promedios de InfoStat: pH, ranqueo, C.V y significancia

Tratamiento	pH Promedio (uds)	Ranqueo	C.V. (%)	<i>p-valor</i> (%)	Significancia
T1	6.88	A	2.85	0.1	**
T3	6.65	AB			
T2	6.45	BC			
T0	6.15	C			

Nota: Elaborado por: La autora, 2017.

Fuente: (InfoStat, 2015)

“***”: Altamente significativo

En la Tabla 13, se indica que el C.V. promedio del ensayo es 2.85% lo cual se establece como una dispersión adecuada de los datos para un ensayo de este tipo. El T1 presenta el mayor pH del proceso con 6.88uds, seguido de T3 con 6.65 uds, T2 con 6.45 uds y finalmente T0 con 6.15 uds. La prueba de Tuckey al 5%, indica que los datos obtenidos están dentro de un ranqueo categorizado como “A” para el T1, “AB” para T3, “BC” para el T2, y finalmente “C” para el T0”, es decir, son estadísticamente diferentes y altamente significativas.

La variación del pH se debe a la acción de los hongos sobre el insecticida. Los procesos metabólicos de ambos hongos pueden modificar el pH del suelo a su beneficio. A pesar de ello, el tratamiento que indica una mayor variación de pH es el T1 muestra de suelo con insecticida más *Trichoderma harzianum*); sin embargo, el T3 (muestra de suelo con insecticida más *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*) también indica un pH ácido cercano a la neutralidad. El T2 y el T0 considerados ácidos son ligeramente más elevados que el pH obtenido en el análisis de muestras en Cayambe de: 5.80 μ ds.

La degradación de Clorpirifos implica un proceso de oxidación e hidrólisis donde se produce la liberación de S cuyos valores aumentan de 6.20 ppm a 67.92 ppm tras la inoculación de los hongos, dando lugar a un Clorpirifos Oxón (*Ver anexo 17, literal d*).

Trichoderma harzianum a través de su metabolismo mediado por esterasas afecta a la estructura química de Clorpirifos, formado con axones y tioato,s mediante reacciones hidrolíticas. El metabolismo se produce principalmente por hidrólisis a través de esterasas. En etapas finales de bidegradación los enlaces de C-P se rompen especialmente en aquellos grupos fosfonatos y fosfinatos (Inchem, 1972). La hidrólisis del Clorpirifos también implica la liberación de iones H^+ lo cual, según (Ibáñez, 2007), promueve la disminución del pH del suelo. Cationes básicos como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ generan un suelo más ácido, obviamente dependiendo de las concentraciones. En los laboratorios de Cayambe estos valores no varían y se encuentran dentro de límites adecuados (ok) y altos (A). Es decir, las variaciones de los macro y micronutrientes en el suelo dependen del pH (*Ver anexo 17, literal d*).

Según (Vera, 2003) y (Macalady & Wolfe, 1983) el rango del pH en el cual microorganismos como los hongos crecen óptimamente y que favorecen sus procesos enzimáticos está entre 5.2 a 6.7. y la acción del sistema metabólico de los hongos sobre estos. Así que dependiendo del pH y del organismo las concentraciones van aumentar o disminuir.

La degradación del insecticida Clorpirifos implicó también una variabilidad de la cantidad de materia orgánica y la conductividad eléctrica. Las concentraciones están enmarcadas dentro de una categorización descriptiva: ok: adecuado, A: alto y B: bajo. La acción de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus* sobre Clorpirifos está relacionada con su metabolismo. En este caso, se considerarán los macronutrientes: P y S, y de los micronutrientes: el Fe. Este P es incorporado en el proceso metabólico de *Pleurotus ostreatus* a través de P-450 monooxigenasa, considerado un biocatalizador. El P incorporado al sistema enzimático de *Pleurotus ostreatus* permite además la incorporación de oxígeno al sistema, por esta razón la concentración de P inicial de 24.30 ppm disminuye a 1.11 ppm (Ver Anexo 17, literal g). P-450s son un nombre colectivo dado para todas las hemo-proteínas que forman un complejo Fe (II)- CO. Se sabe que estas enzimas oxidan más de 200 000 diferentes sustancias químicas exógenas y endógenas (Urlacher & Eiben, 2006) y es por esto también que la concentración de Fe inicial pasa de 214.31mg/L a 405.86 mg/L. La actividad enzimática está relacionada con la interacción entre Fe y S. Ambos nutrientes se incrementan considerablemente. En un inicio sufren un proceso oxidativo donde el oxígeno se incorpora a la relación entre el Fe-S. Luego, en una segunda etapa, la relación O-Fe-S se ve influenciada por la llegada de un catión de H el cual

reacciona con el O liberándose en forma de agua. Luego, la llegada de un radical R-OH permite que el S se libere en forma de óxido de azufre (SO) y se libere el Fe. El azufre pasa de una concentración inicial de 5.80 ppm a una concentración final de 67.92mg/. Según (Cerveñansky, 2011), si la cantidad de S en el suelo es mayor a 200 ppm existe mineralización, si es menor existe inmovilización (Cerveñansky, 2011). De esta manera, se comprueba que tras el proceso y considerando las condiciones de temperatura, humedad y pH. La conductividad eléctrica en el proceso disminuye de 1.42 mS/cm a 1.14 mS/cm, valores considerados como adecuados (*Ver anexo 17, literal d*).

Otro factor es la composición de la materia orgánica, su estabilidad ya que si esta es estable habría mayor resistencia a la mineralización o una mayor pérdida de C y N (Cerveñansky, 2011). En el ensayo la cantidad de materia orgánica aumentó en el suelo de 2.50% a 3.71% lo cual indica que la estabilidad de la materia orgánica dependió de la acción de los hongos. También existe la posibilidad que la materia orgánica por su carga negativa, adsorba y retenga a estos microorganismos según menciona (Goyal y Gerba, 1979) y (Julca-Otiniano, Meneses-Florián, Blas-Sevillano, & Bello-Amez, 2006) aumentando así su peso ya que los microorganismos cuentan al momento de establecer un peso porcentual de materia orgánica en el suelo.

El valor obtenido del *p-valor* de 0.1% indica que, el ensayo al ser un proceso altamente significativo, se acepta la hipótesis alternativa: la biodegradación de un insecticida

organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa es posible mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.

3.5.4 Biodegradación removida de Clorpirifos ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Tabla 14. Biodegradación de Clorpirifos: concentraciones.

Tratamientos	Repeticiones	Concentración Inicial ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Concentración Final ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Concentración Removida ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Medias ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Porcentaje de remoción (%)	C.V. (%)	Ranqueo	p-valor (%)	Significancia									
T3	T3R1	4043.38	1317.92	2725.46	2701.09	66.80	6.00	A	0.22	**									
	T3R2	4043.38	1173.45	2869.93															
	T3R3	4043.38	1444.72	2598.66															
	T3R4	4043.38	1433.07	2610.31															
T1	T1R1	4043.38	1521.81	2521.57	2407.33	59.54		6.00			AB	0.22	**						
	T1R3	4043.38	1750.30	2293.08															
T0	T0R1	4043.38	1962.54	2080.84	2121.75	52.47					6.00			B	0.22	**			
	T0R4	4043.38	1880.73	2162.65															
T2	T2R1	4043.38	2201.14	1842.24	2047.25	50.63								6.00			B	0.22	**
	T2R2	4043.38	1874.97	2168.41															
	T2R4	4043.38	1912.29	2131.09															

Nota: Elaborado por: La autora, 2017.

Fuente: (InfoStat, 2015)

“***”: Altamente significativa

En la Tabla 14, se observa el porcentaje de remoción del insecticida Clorpirifos. El C.V. del ensayo es de 6.00% lo cual se establece como una dispersión confiable ya que están dentro de los valores establecidos para un ensayo de este tipo. El tratamiento que presentó mayor porcentaje de remoción fue el T3 con el 66.80% equivalente a 2701.09 $\mu\text{g}/\text{g}$, luego está el T1 con el 59.54% equivalente a 2407.33 $\mu\text{g}/\text{g}$, seguido del T0 con 52.47% equivalente a 2121.75 $\mu\text{g}/\text{g}$, y finalmente, el T2 con 50.63% equivalente a 2047.25 $\mu\text{g}/\text{g}$. La prueba de Tuckey al 5%, indica que los datos obtenidos están dentro de un ranqueo categorizado como “A” para el T3, “AB” para T1, y finalmente “B” para el T0 y T2, es decir, son estadísticamente diferentes y altamente significativas (Ver anexo 17, literal e-

f). Esta disminución de la concentración se debe a la acción del metabolismo de los hongos sobre el insecticida, está desdoblando e incorporándolo a su proceso metabólico. La enzima microbiana hidrolasa organofosforada u organofosfohidrolasa ha sido reportada en el citoplasma de muchos microorganismos. Generalmente, rompe el enlace P-O fosfotriéster y la unión P-S en los fosfotiolésteres siendo estos el caso del Clorpirifos donde se generan dos metabolitos principales: el 3,5,6-tricloro-2-piridinol y el dietilfosfato (DETP) (Jhon & Shaik, 2015). Cuando se realiza la degradación de cantidades pequeñas de clorpirifos se producen otros metabolitos tales como: desetil clorpirifos, clorpirifos oxon, desetil clorpirifos oxon y 3,5,6-tricloro-2 metoxypirimidina. Clorpirifos oxon es la forma oxidada de clorpirifos y se hidroliza tanto enzimáticamente como espontáneamente para formar dietilfosfato y 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Este último puede degradarse adicionalmente a 3,5,6-tricloro-2-metoxi-piridina y dióxido de carbono (Jhon & Shaik, 2015). El metabolismo secundario de *Trichoderma harzianum* permite que a través de la hidrólisis, la molécula se degrade y muestre concentraciones como las observadas anteriormente, y a través de la Ruta del Shikimato para el cual la molécula de Clorpirifos. En este caso el aumento y la disminución de temperatura en el suelo se debe al proceso metabólico de los hongos donde, para degradar la molécula química del Clorpirifos, se necesitan de procesos hidrolíticos cuyas enzimas transferasas permitirán al adhesión o la ruptura de la molécula absorbiendo o liberando energía en el proceso (Inchem, 2002).

El valor obtenido del *p-valor* de 0.22% indica que, el ensayo al ser un proceso altamente significativo, se acepta la hipótesis alternativa: la biodegradación de un insecticida

organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa es posible mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.

CONCLUSIONES

- Csiro Piri Software ayuda a determinar el impacto que tiene un agroquímico (insecticida, herbicida, entre otro) sobre el medio ambiente considerando sus porcentajes de movilidad y toxicidad con relación a las aguas superficiales, subterráneas del sector muestreado y su repercusión en el medio ambiente y la salud humana.
- La biodegradación es un proceso que puede llevarse a gran escala mediante la formulación, elaboración y comercialización de productos agrarios a base de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus* a fin de mejorar: la calidad de los cultivos, la ecología y estructura del suelo e incrementar la materia orgánica, sustituyendo a productos agrícolas convencionales y formando plantas socialmente responsables y ambientalmente sostenibles.
- La temperatura, la humedad, los macro y micronutrientes son factores influyentes que tienden a potenciar el crecimiento de los hongos en el suelo biodegradando un plaguicida en menos tiempo considerando la biodiversidad microbiana.
- El Clorpirifos es un insecticida peligroso para el ambiente, puesto que su potencial de toxicidad es alto implicando así peligros agudos y crónicos tanto en la biomasa vegetal, animales y en el hombre produce inhibición de la acetilcolinesterasa dañando el sistema nervioso.

RECOMENDACIONES

- Muestrear durante de fase de brotación, desarrollo de la hoja y el inicio de la formación del tubérculo puesto que son fases en las cuales la aplicación de plaguicidas es mayor en comparación con la fase de post-cosecha.
- Aplicar el Programa Csiro Piri Software en otros cultivos de importancia a nivel nacional como con el cacao fino de aroma, el café, plátano y flores, puesto que son productos de consumo nacional y de importancia económica a nivel internacional.
- Evaluar la capacidad de biotransformación de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes concentraciones de insecticida.
- Evaluar la concentración de insecticidas en los tres tipos de papas más representativas y de mayor consumo de la provincia Carchi para determinar su incidencia en la salud de los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies. (Mayo de 2014). *Setting up a Quantitative Analysis: MS ChemStation*. Obtenido de <http://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05214.pdf>
- Agroecuador. (2014). *La papa en Ecuador*. Obtenido de http://agroecuador.com/web/index.php?option=com_content&view=article&id=930:la-papa-en-ecuador&catid=137:papa&Itemid=88
- Aguilar, P., Chin, J., & Ruíz, K. (2014). Uso del “Pesticide Impact Rating Index” (PIRI) para estimar la peligrosidad del uso de plaguicidas en el cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.). *Mundo da Saúde*, 38(1), 24-30. Obtenido de http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/artigos/mundo_saude/uso_pesticide_impact_rating_index.pdf
- Aldás, M. (2012). *Uso de insecticidas en el cultivo de papa (Solanum tuberosum), por los socios de la corporación de asociaciones agropecuarias del Cantón Quero “COAGRO-Q”*. Obtenido de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3939/1/Tesis-35a>
- Alvesi, A., Rezende, M., Hovell, A., Bizzo, H., Oliveira, A., Rodriguez, S., & Rezende, C. (Febrero de 2012). Comparison between GC-MS-SIM and GC-ECD for the determination of residues of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazilian citrus essential oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2(23). Obtenido de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532012000200017

- Argumendo, D., Alarcón, A., Ferrera, C., & Peña, C. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4), 1-15.
- Arias, E. (Junio de 2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca t Cruz Verde*. Obtenido de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
- Atlas, R., & Unterman, R. (1998). *Bioremediation*.
- Badii, M., & Varela, S. (Diciembre de 2007). *Insecticidas Organofosforados: efectos sobre la Salud y el Ambiente*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/28249214_Insecticidas_Organofosforados_efectos_sobre_la_Salud_y_el_Ambiente
- Baird, C. (2001). *Química Ambiental*. Reverté S.A.
- Barnett, H. (1960). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (2da. ed.). West Virginia , Estados Unidos : Burgess Publishing Company .
- Batta, Y., Zatar, N., & Sama´negh, S. (2005). Quantitative Determination of Chlorpiripfos and Penconazole residuos in grapes using gas Chromatography/ Mass Spectrometry . *Journal of Food Technology* , 3(3), 284-285. Obtenido de https://staff.najah.edu/media/sites/default/files/Quantitative_Determination_of_Chlorpyrifos_and_Penconazole_Residues_in_Grapes_Using_Gas_Chromatography_Mass_Spectrometry.pdf

- Benedico, E. (Mayo de 2002). *Insecticidas organofosforados. "De la guerra química al riesgo laboral y doméstico"*. Obtenido de <http://scielo.isciii.es/pdf/medif/v12n5/hablemosde.pdf>
- Benítez-Díaz, P., Miranda-Contreras, L., Molina-Morales, Y., Sánchez-Gil, B., & Balza-Quintero, A. (Abril de 2015). Residuos de plaguicidas en la cáscara e interior de la papa (*Solanum tuberosum* L.) proveniente de una región agrícola del estado Mérida, Venezuela. *Bioagro*, 27(1). Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612015000100004
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol*, 124(1), 128-145.
- Brom, R. (2014). *Comportamiento de los residuos de Clorpirifos en uvas y vinos*. Obtenido de http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/6085/comportamiento-de-los-residuos-de-clorpirifos.pdf
- Bumpus, J., Kakar, S., & Coleman, R. (1993). Fungal degradation of organophosphorous insecticides. . *Appl Biochem Biotechnol*, 399(1), 715-726.
- Carvajal, G. (2010). *Evaluación de la producción de Pleurotus ostreatus sobre cinco tipos de sustratos (tamo de trigo, tambo de cebada, tambo de vicia, tambo de avena y paja de páramo; enriquecidos con tuza molida afrecho de cebada y carbonato de calcio)*. . Obtenido de [file:///C:/Users/Lucia/Downloads/T72379%20\(11\).pdf](file:///C:/Users/Lucia/Downloads/T72379%20(11).pdf)
- Castro. (2012). *Trichoderma harzianum: modos de acción, eficiencia y usos en el cultivo de café*. Obtenido de <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/577/1/038.pdf>

- Castro, A., & Rivillas, C. (2012). *Trichoderma spp.: Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café*. Obtenido de <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/577/1/038.pdf>
- Celeromics. (s.f.). *Fórmula de la Cámara Neubauer: cálculos en la Cámara Neubauer*. Obtenido de <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion-1.php>
- Cerveñansky, A. (2011). *Azufre: Fertilidad*. Obtenido de http://www.fagro.edu.uy/fertilidad/curso/docs/azufre_impr.pdf
- Chávez, M. (2006). *Producción de Trichoderma sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. Obtenido de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
- Cholango, L. (2009). *Selección de cepas de Trichoderma sp. in vitro, para el control de problemas radiculares en flores de verano CHECA – ECUADOR*. Sangolquí. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2599/1/T-ESPE-IASA%20I-004154.pdf>
- ClimateData. (2016). *Clima: Capulí Chico*. Obtenido de <https://es.climate-data.org/location/178043/>
- Csiro Piri Software. (2017). Pesticide Impact Rating Index: papa.
- Del Puerto Rodríguez, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). *Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud (Effects of pesticides on health and the environment)*. Obtenido de http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol52_3_14/hig10314.htm

- Del Puerto, A., Suárez, S., & Palacio, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud (Effects of pesticides on health and the environment) . *Rev Cub Hig Epidemiol.*, 52(3). Obtenido de http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol52_3_14/hig10314.htm
- Diagnostics, B. (2009). *Difco and BBL Manual: Manual of microbiological culture medial.* Obtenido de https://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcoblmanual_2nded_lowres.pdf
- FAO. (2010). *Definiciones para los fines del Codex Alimentarius* . Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/w5975s/w5975s08.htm>
- FAO. (2017). *Hoja de datos sobre los plaguicidas* . Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/005/X2570S/X2570S10.htm>
- FAO, & OMS. (2015). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas* . Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf>
- Farmagro. (2012). *Papa*. Obtenido de <http://www.farmagro.com.ec/pdfs/papa.pdf>
- Fernández S., P., & Díaz S., P. (2001). *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo.* Obtenido de Significancia estadística y relevancia clínica. : https://www.fisterra.com/mbe/investiga/signi_estadi/signi_estadisti2.pdf
- Fernández, D., Mancipe, L., & Fernández, D. (Junio de 2010). Intoxicación por Organofosforados (Organophosphorus Poisoning). *Revista Med*, 18(1), 84-92. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-52562010000100009

- FQUIM. (2006). *Biorremediación: organismos que limpian el ambiente*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IQM_fitorremediacion_biotec__25656.pdf
- Frazar, C. (2000). *Dioremediation and phytoremediation of pesticides contaminated sites. Prepair for US Enviromental Protection Agency,Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office*. . Obtenido de <http://www.clu-in.org>
- Gallegos, P., Castillo, C., Báez, F., Suquillo, J., Sevillano, C., Asaquibay, C., . . . Chulde, F. (2010). *Uso de insecticidas para el control del gusano blanco de la papa, Premnotrypes vorax H., en la provincia del Carchi*. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/505/1/iniapscdt162.pdf>
- Gallegos, P., Suquillo, J., Baéz, F., Sevillano, C., Asaquibay, C., C., C., . . . Chulde, F. (Junio de 2011). *Sondeo de plaguicidas utilizados para el control del gusano blanco de la papa en tres cantones de la provincia del Carchi*. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2852>
- García, S., & López, A. (Diciembre de 2013). *Trichoderma harzianum*. Obtenido de <https://prezi.com/bf3ewbfrjtvu/trichoderma-harzianum/>
- Garzón, J. P., & Cuervo, J. (20 de Noviembre de 2008). *Producción de Pleurotus ostreatus sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia*. Obtenido de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA10_ARTORIG2_pleur.pdf

- Gato, C. Y. (Septiembre de 2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai . *FITOSANIDAD*, 14(3), 189-195. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209115199008>
- Gebremariam, S., Beutel, M., Yonge, D., Flury, M., & Harsh, J. (2012). Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. *Rev Environ Contam Toxicol.*(215), 123-75. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22057931>
- Gilchrist, S., Fuentes, D., Martínez, C., López, A., Duveiller, R., Singh, M., & García, A. (2005). *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. (2da. Edición ed.). México, D.F.: CIMMYT.
- Glazer, A., & Nikaido, H. (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. New York : W.H. Freeman and Company.
- González, L. (1999). *Pontificia Universidad Católica del Ecuador: Prácticas de la Escuela de Tecnología Médica* . Quit-Ecuador.
- Googe Map b. (2017). *Calacalí, Provincia de Pichincha*. Obtenido de <https://www.google.com.ec/maps/@0.0249445,-78.5428287,10z>
- Google Map a. (2017). *El Capulí, Provincia del Carchi*. Obtenido de <https://www.google.com.ec/maps/@0.5764245,-77.8722296,11z>
- Guzmán. (1977). *Micología Médica*. Instituto Nacional de Salud. Bogotá-Colombia.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol*, 9(11), 177-192.

- Ibáñez, J. J. (Abril de 2007). pH del suelo. Obtenido de <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/04/02/62776>
- Inchem. (1972). *Chlorpiryfos*. Obtenido de <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v072pr10.htm>
- InfoStat. (2015). InfoStat (IS) Software Estadístico .
- INIAP. (2016). *Catálogo de variedades de papas del Ecuador* . Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2748/1/iniapscpm427.pdf>
- Jaramillo, B., Martelo, I., & Duarte, E. (2013). Toxicidad aguada de pesticidas organofosforados y análisis de la relación cuantitativa de estructura actividad (QSAR). *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 76-84. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n2/v11n2a09.pdf>
- Jerina, D. (1993). *Metabolism of aromatic hydrocarbons by the cytochrome P-450 system and epoxide hydrolase*.
- Jhon, E., & Shaik, J. (2015). Chlorpyrifos: Pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 13(3), 269-291. Obtenido de [doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10311-015-0513-7](http://dx.doi.org/10.1007/s10311-015-0513-7)
- Julca-Otiniano, A., Meneses-Florián, L., Blas-Sevillano, R., & Bello-Amez, S. (Abril de 2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura (Organic matter, importance, experiences and it role in agriculture). *INDESIA*, 24(1), 49-61. Obtenido de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292006000100009

- Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). A Review: Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants. *Enzyme Research*. Obtenido de <https://www.hindawi.com/journals/er/2011/805187/abs/>
- Kookana, R., Corell, R., & Miller, R. (2014). *Pesticide Impact Rating Index (PIRI) Software*. Obtenido de <https://data.csiro.au/dap/landingpage?pid=csiro:11514&v=3&d=true>
- Laboratorio de suelos y agua-Cayambe. (2016). *Informe de Resultados: Muestra Dos*. Quito, UPS.
- LMEER. (2017). Laboratorio del Ministerio de Energías y Recursos Renovables.
- López-Rodríguez, C., Hernández, R., & Suárez, C. (14 de Octubre de 2008). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Javeriana*, 13(2). Obtenido de <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/1417/4438>
- LORSBAN. (2017). *Ficha Tècnica: Insecticida Agrícola-Concentrado Emulsionable*.
- Macalady, D., & Wolfe, N. (1983). New perspectives on the hydrolytic degradation of the organophorothioate insecticide chlorpyrifos. *Journal of agricultural and food chemistry*, 31(6).
- MAGAP. (25 de Junio de 2013). *El cultivo de papa en Ecuador y planes de mejora*. Obtenido de http://192.156.137.121:8080/cipotato/region-quito/congresos/v-congreso-ecuatoriano-de-la-papa/carol_chehab.pdf

- Mai, S., Ninga, E., Cara, M., & Mukaj, M. (8 de Abril de 2016). Determination of Chlorpyrifos Residues in Lettuce by GC MS/MS. . *Global Virtual Conference* .
Obtenido de [file:///C:/Users/home/Downloads/Determination%20of%20Chlorpyr%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/home/Downloads/Determination%20of%20Chlorpyr%20(1).pdf)
- Manjarrés, K., Castro, A., & Rodríguez, E. (2010). Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación.*, 7(2), 9-10. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69519014002>
- Medauraa, M., Guivernau, M., Prenafeta, F., Moreno-Ventasc, Xavier, & Viñas-Canals, M. (2013). *Micorremediación y su aplicación para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos pesados* . Obtenido de <http://www.redisa.uji.es/artSim2013/TratamientoYValorizacionDeResiduos/Micorremediacion%20y%20Aplicacion%20Tratamiento%20Suelos%20Contaminados%20con%20Hidrocarburos.pdf>
- Menolli, N., Asai, T., Capelari, M., & Paccola-Meirelles, L. (Abril de 2010). Morphological and molecular identification of four Brazilian commercial isolates of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*, 53(2). Obtenido de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132010000200019
- Morell, I., & Hernández, F. (2000). *El agua en Castellón: El reto para el siglo XXI*. Athenea. Obtenido de

https://books.google.com.ec/books?id=HKiGvoP8cj4C&pg=PA235&lpg=PA235&dq=Condiciones+de+degradaci%C3%B3n+del+diazinon:+ph+y+temperatura&source=bl&ots=Tf2qL1NUWi&sig=Pe3wf_JLX2GGE7qLnPSWLRs5Ooc&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjCofnj39TRAhXE0iYKHQQRAyYQ6AEINzAF#v=onep

Mukherjee, A. K., Sampath, A., Kranthi, S., & Mukherjee, P. K. (30 de Junio de 2014).

Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. *Springer*, 4(3), 275-281. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026447/>

Narváez, J., Palacio, J., & Molina, F. (02 de Noviembre de 2010). Presencia de plaguicidas

en el ambiente y su ecotoxicidad: una revisión de los procesos de degradación natural. *Gestión y Ambiente*, 15(2), 27-38. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/35839/1/36278-151112-1-PB.pdf>

Novoynny, C., Rawall, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V., & Molitoris, H. (2001). Capacity

of *irpex lecteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*.

Obiolis, J. (1999). *Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y toxicocinética*.

. Centro Nacional de Condiciones de Trabajo. Guía de buenas prácticas NTP 512, España. Obtenido de Obiolis, J. (1999) *Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y toxicocinética*. España: Centro Nacional de Condiciones de Trabajo. Guía de buenas prácticas NTP 512

OMS. (2000). *Organización Mundial de la Salud, FAO/OMS, Codex Alimentarius, FAO*.
Obtenido de www.fao.org/organicag/default.htm.

Pérez, G. E. (2014). *Estudio de la ruta de shikimato en Trichoderma parareesei, su papel en el antagonismo del hongo y en las relaciones que establece con la planta*. Universidad de Salamanca, Salamanca. Obtenido de http://gredos.usal.es/xmlui/bitstream/handle/10366/127848/DMG_PerezGonzalezE_RutaShikimato.pdf?sequence=1

Picco, E., Rodríguez, C., & Boggio, J. (11 de Enero de 2011). *Clorpirifos: Aspectos cinéticos a considerar en su uso clínico como antiparasitario en veterinaria*. Obtenido de <https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2011/1/11/45513.pdf>

Quintero, J. (02 de Febrero de 2011). Pesticides Degradation by White Rot Fungi: A Review (Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 64(1), 5867-5882. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n1/a12v64n01.pdf>

Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (01 de Mayo de 2014). *Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*. Obtenido de http://www.sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2014-05-01_11-59-0899004.pdf

Rani, N., & Lalithakumari, D. (1994). Degradation of methyl parathion by Pseudomonas putida. *Canadian Journal of Microbiology*., 40(12), 1000-1006.

Reddy, G., & Gold, M. (2000). Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium* intermediates and reactions involved. *Microbiology*, *146*, 405-413.

Rivas, J. (09 de Junio de 2010). Las actividades con más impacto ambiental. *El Litoral* .
Obtenido de
<http://www.ellitoral.com/index.php/diarios/2010/06/09/medioambiente/MED-02.html>

Romero, O., Huerta, M., Huato, M. A., Domínguez, F., & Arellano, D. A. (9 de Octubre de 2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Rev. Colomb. Biotecnol.* , *11*(2), 143-151.
Obtenido de
[41019651_Caracteristicas_de_Trichoderma_harzianum_como_agente_limitante_en_el_cultivo_de_hongos_comestibles](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1657455109704101)

Sánchez-Brunette, C., Albero, B., Martín, G., & Tadeo, J. L. (2005). Determination of pesticides residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. *ANALYTICAL SCIENCES*, *21*. Obtenido de
https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/21/11/21_11_1291/_pdf

Semple, K., Morriss, A., & Paton, G. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, *54*(4), 809-818.

SENPLADES. (2013). *Plan Nacional de Buen Vivir: Todo el mundo mejor*. Obtenido de
<http://documentos.senplades.gob.ec/Plan%20Nacional%20Buen%20Vivir%202013-2017.pdf>

- Silva, S., & Correa, F. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: Revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. . *Semestre Económico*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/seec/v12n23/v12n23a2.pdf>
- Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428-471. Obtenido de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x/full>
- Suárez, C. (2010). *Obtención in vitro de micelio de hongos Shiitake (Lentinula edodes) y orellanas (Pleurotus ostreatus y Pleurotus pulmonarius) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos para la producción de semilla*. . Bogotá. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/2792/1/107407.2010.pdf>
- Tang, J., Liu, L., Huang, X., Li, Y., Chen, Y., & Chen, J. (2010). Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* mycelia stressed by organophosphate pesticide dichlorvos. *Can J Microbiol* , 56(1), 21–127.
- Tripathi, P., Poonam, C. S., Mishra, A., Puneet, S. C., & Dwivedi, S. R. (2013). *Trichoderma*: A potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(4), 541-550. Obtenido de <http://dx.doi.org/>
- University of Hertfordshire. (19 de Octubre de 2016). *PPDB: Pesticides Properties DataBase*. Obtenido de Clorpirifos (Ref: OMS 971): <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/154.htm>
- UNODC. (Octubre de 2010). *Problemática ambiental y la utilización de agroquímicos en la producción de coca*. . Obtenido de

http://www.unodc.org/documents/peruandecuador//Informes/Informes-Analiticos/Informe_Analitico_Agroquimicos.pdf

Urlacher, V., & Eiben, S. (2006). Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. . *Trends in Biotechnology*, 24(7), 324-330.

Vásquez, J. (2010). *Caracterización microbiológica y producción de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride en cultivo artesanal*. Pontificia Universidad Javeriana , Bogotá. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8662/tesis615.pdf?sequence=1>

Vera, R. (2003). *Perfiles por País del Recurso Pastura/Forraje: Ecuador*. Obtenido de http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/Counprof/spanishtrad/ecuador_sp/ecuador_sp.htm

Vittozzi, F., Di Consiglio, E., & Testai, E. (2001). Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. . *Environment International.*, 26(3), 125-129 . Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11341695>

Wood, P. (1992). A comparison of peroxidase and cytochrome P-450. *Biochemical Society Transactions*, 20(2), 349-352.

ANEXOS

Anexo 1. Georeferenciación

a. Ubicación Sector El Capulí-Provincia del Carchi



Fuente: (Google Map a, 2017)

b. Ubicación Sector Calacalí- Provincia de Pichincha



Fuente: (Google Map b, 2017)

Anexo 2. Georeferenciación y toma de muestras



a. Sector del cultivo de papa en El Capulí, San Gabriel, Provincia del Carchi donde se realizó la georeferenciación de los 14 puntos de muestreo.



b. Recolección de la muestra del suelo para la implementación del ensayo.



c. Homogenización de la muestra tomada



d. Muestras etiquetadas para llevarlas a analizar



e. Cooler para el transporte de muestras

Anexo 3. Georeferenciación de puntos de muestreo

Punto de Muestreo	Altura (m.s.n.m)	Coordenadas (UTM)
Punto 1	2 779	018-N 4 818/ 0063420
Punto 2	2 779	018-W/ 0063421
Punto 3	2 779	018-N 4 823/ 0063324
Punto 4	2 779	018-N 4 836/ 0063421
Punto 5	2 779	018-N 4 833/ 0063410
Punto 6	2 779	018-N 4 820/ 0063412
Punto 7	2 779	018-N 4 820/ 0063412
Punto 8	2 779	018-N 4 814/ 0063433
Punto 9	2 779	018-N 4 825/ 0063469
Punto 10	2 779	018-N 4 823/ 0063463
Punto 11	2 779	018-N 4 811/ 0063469
Punto 12	2 779	018-N 4 792/0063470
Punto 13	2 779	018-N 4 782/0063432
Punto 14	2 779	018-N 4 786/0063347

Elaborado por: La autora, 2017.

Anexo 4. Información primaria para el Csiro Piri Software

Uso del suelo	Papa	
Tipo de suelo	Arenoso arcilloso limoso	
Mes de inicio para el periodo de interés (incluido)	Abril	
Mes de finalización para el periodo de interés (incluido)	Mayo	
Toxicidad a especies blanco	Health Advisory Limits (USEPA)(mg/L)	
Cobertura	Suelo desnudo	
Indicativo de la severidad de pérdida de suelo	Toque de sedimentos en el agua	
Condiciones de humedad del suelo durante el periodo de interés	Húmedo	
Contenido de materia orgánica (%)	2.5	
Precipitación total durante el periodo de interés (mm)	168	
Irrigación total durante el periodo de interés (mm)	60	
Rango de recargo durante el periodo de interés (mm)	Estimado : 69.645213273	
Media de la temperatura mínima del aire durante el periodo de interés (grados °C)	8	
Media de la temperatura máxima del aire durante el periodo de interés (grados °C)	21	
Profundidad de la tabla de agua (metros)	3	
Diámetro del cuerpo de agua más cercano (metros)	3	
Distancia desde el borde del cultivo al cuerpo de agua	13	
Pendiente del terreno al cuerpo de agua	10.20 grados	18%
Ancho de la zona búfer o amortiguadora (metros)	2	
Número mínimo de días a partir de la aplicación del pesticida y la primera lluvia/ irrigación	1	

Nota: Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

Anexo 5. Construcción de la cámara climatizada



b. Colocación de las mallas plásticas cuadrículadas dentro de la caja de vidrio.



a. Recipiente con agua, humidificador, evaporador y toallas de microfibra.



d. Hongos creciendo en fundas con sustrato a base de arcilla y melaza.



c. Implementación de luz Led sobre la cámara.



e. Terrario climatizado construido y funcionando

Anexo 6. Preparación del suelo e inoculación del insecticida



b. Colocación del suelo muestreado sobre una funda plástica negra.



a. Suelo homogenizado y retiro de residuos de plantas y papas.



d. Insecticida a base de Clorpirifos a inocular



c. Insecticida, agua (medio líquido para hacer la dilución) e indumentaria de protección para realizar la preparación del inóculo y la aplicación.

Tiempo (días)	Dosis (mL/L)
1	1
2	6
4	12
5	24
7	36
8	72
10	99
11	250

e. Dosis del insecticida aplicado en diferentes días.



f. Suelo con el insecticida inoculado y homogenizado.

Anexo 7. Implementación del diseño experimental



a. Materiales para la implementación del ensayo: balanza, cajas, tijeras.



b. Balanza para pesar 1kg de suelo.



d. Peso de 1 kg de suelo para cada una de las repeticiones.



c. Peso de 1 kg de suelo para cada una de las repeticiones.



e. Implementación completa del ensayo experimental.

Anexo 8. Método Olsen Modificado

Se considera el Protocolo del Laboratorio de Suelos y Agua de la Universidad Politécnica Salesiana- Cayambe. El Manual para Análisis de Suelos explica cómo se realizó la evaluación de macronutrientes. Sin embargo, se toman en cuenta sólo los más relevantes para el caso de Clorpirifos.

a. Determinación de fósforo asimilable

Principio

Extracción del fósforo por una solución alcalina (bicarbonato de sodio 0.5N, pH 8.5). Dosificación después por colorimetría a 660 nm con el reactivo sulfo-molibdico.

Equipos

- Balanza analítica.
- Embudos de papel filtro.
- Fotómetro Genesys 20.
- Pipetas de diferentes volúmenes.
- Erlenmeyer de 50 mL.

Reactivos:

Solución de bicarbonato de sodio (CO₃HNa) 0.5N de un pH 8.5.

- Para dos litros de solución:
- Pesar separadamente 84 g de bicarbonato de sodio PA y 7.44 g de EDTA sobre una balanza de precisión, posteriormente pasarlos a un balón aforado de 2 L, aforar el balón con agua destilada, ajustar el pH a 8.5 con una solución de sosa concentrada.

Solución sulfo-molibdica: Pesar en la balanza de precisión 25 g de molibdato de amonio PA, pasar a un balón aforado de un litro y completar con una solución de ácido sulfúrico 10N, conservarlo en un frasco oscuro y mantenerlo en la oscuridad.

Procedimiento

- Pesar 2.5 g de la muestra tamizada a 0.5 mm, colocar la muestra en matraces de 150 ml para posteriormente agregar 25 mL de la solución extractante (CO_3HNa).
- Pasar la muestra a un agitador oscilante por 10 min.
- Durante este tiempo, instalar el papel filtro sobre los vasos de precipitación 100 mL.
- Filtrar la muestra tratando de hacer pasar el máximo de suelo sobre el filtro.
- Preparar la solución indicadora de acuerdo a la cantidad de muestras analizadas.
- En un erlenmeyer de 50 mL agregamos en el siguiente orden 10 mL de agua, 2 mL de la muestra y 8 mL de la solución molibdato de amonio-ácido ascórbico.
- Dejar desarrollar la coloración en el lapso de 20 a 30 min. Realizar la lectura en el fotómetro a 660 nm.

b. Determinación de Potasio

Principio

- La determinación de este método está bien estudiada, existiendo métodos adecuados para su análisis.
- La determinación de potasio se realizó utilizando el método de fotometría de llama, cuyas lecturas se efectuaron en meqK/L solución.

Equipos

- Balones de 1000 mL y 100 mL.
- Fotómetro de llama.
- Pipetas de diferentes volúmenes.
- Vasos de precipitados de 150 mL
- Vasos de precipitados plásticos de 50 mL

Reactivos

- Solución de bicarbonato de sodio (CO_3HNa) 0.5N de un pH 8.5.
- Para dos litros de solución: pesar separadamente 84 g de bicarbonato de sodio PA y 7.44 g de EDTA sobre una balanza de precisión, posteriormente pasarlos a un balón aforado de 2 L, aforar el balón con agua destilada, ajustar el pH a 8.5 con una solución de sosa concentrada.

Procedimiento

- Pesar 2.5 g de la muestra tamizada a 0.5 mm, colocar la muestra en matraces de 150 mL para posteriormente agregar 25 mL de la solución extractante (CO_3HNa).
- Pasar la muestra a un agitador oscilante por 10 min.
- Durante este tiempo, instalar el papel filtro sobre los vasos de precipitación 100 mL.
- Filtrar la muestra tratando de hacer pasar el máximo de suelo sobre el filtro.
- En un vaso de precipitado plástico agregar en el siguiente orden 19 ml de agua destilada, 1 mL de la muestra
- A continuación procedemos a leer en el fotómetro de llama.

Anexo 9. Método de Acetato de Amonio

Se considera el Protocolo del Laboratorio de Suelos y Agua de la Universidad Politécnica Salesiana- Cayambe.

a. Determinación de Calcio y Magnesio juntos

Principio

- El Calcio es el quinto elemento en abundancia, y tercero entre los metales indispensables para la nutrición de las plantas, existe en la naturaleza como yeso, dolomita, carbonato de calcio, etcétera.
- El Magnesio es el único constituyente mineral de la molécula de la clorofila y su ausencia impedirá el proceso de la fotosíntesis.

Materiales

- Balón de 1000 mL
- Buretas graduadas, 25 mL
- Erlenmeyer, 250 mL
- Gotero
- Pipetas de diferentes volúmenes.
- Microcuchara

Reactivos:

Acetato de amonio 1N (C₂O₂NH₇) pH 7

- Pesar 77 g de acetato de amonio, disolver en agua destilada y llevar a volumen de 1000 mL.
- Ajustar el pH de la solución empleando NaOH, si es inferior a 7 o ácido acético glacial si es superior a 7.

Buffer para Calcio y Magnesio

- Sobre un vaso de precipitado de 1000 ml, en 200 ml de agua destilada disolver 67 g de Cloruro de Amonio e incorporar posteriormente 570 ml de Amoniaco concentrado. Llevar el volumen a 1000 mL en una probeta graduada, mezclar bien la solución.

Solución 0,01N de EDTA Versenato (sal di sódica del ácido etilen di amino tetracético)

- Pesar 2 gr de ácido etilen-di-amino-tetracético (EDTA) y 50 mg (0,05 gr) de Cloruro de Magnesio.
- Disolver en agua destilada y aforar a 1000 mL.

Buffer para Calcio NaOH 1N

- Disolver 40 g de Hidróxido de Sodio en agua destilada, la solución refrigerarla y posteriormente aforar a 1000 mL.

Indicador para Calcio

- Pesar 1 g de Eriocromo black T, disolverlo en 80 ml de trietanol amina. Llevar el volumen a 100 ml con agua destilada.

Indicador Calcio y Magnesio

- Pesar 10 g de sulfato de potasio anhidro y agregar 1 g de Murexida. La mezcla homogenizar y refinar en un mortero.
- Guardar en un frasco oscuro.

Procedimiento

- Pesar 2.5 g de suelo seco al aire, tamizado por el tamiz de 2 mm y colocarlo en un Matraz de 125 mL y agregar 50 mL de Acetato de Amonio 1 N.
- Colocar el matraz con la solución en un agitador rotativo a 350 revoluciones por minuto por 10 min. Posterior a la agitación dejar reposar la solución por 15 min, a continuación proceder a filtrar la muestra.

Anexo 10. Método de QUECHERS



a. Selección del suelo para el pesaje.



b. Pesaje de 5 g de muestra de suelo en un tubo de 50 mL.



c. Colocación de ACN



d. Pesaje de sulfato de sodio anhidro



e. Momento en que se añade 1 g de NaCl de citrato trisódico dihidratado y 0.5 g de citrato disódico sesquihidratado

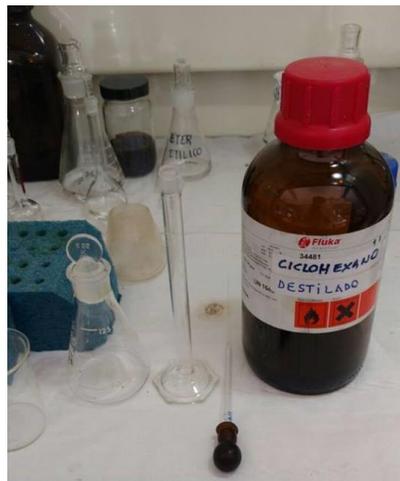


f. Sobrenadante + ciclohexano + Na_2SO_4 anhidro

Anexo 11. Método de GC/MS (Cromatografía de gases aplicado a masas)



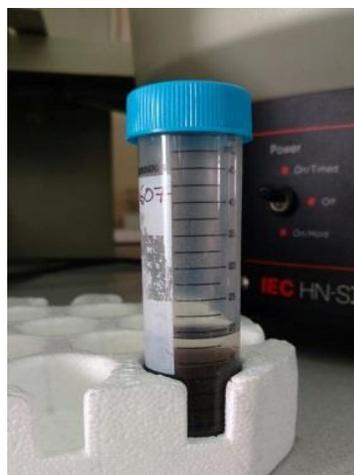
a. Pesaje de la muestra de suelo (5g) y sulfato de sodio anhidro (15 g).



b. Ciclo hexano pesaje de 10 mL.



c. Baño ultrasónico de las muestras durante 10 min.



d. Muestra lista para ser centrifugada durante 4 min a 3000 rpm.



e. Colocación de las muestras en el GC/MS después de ser diluidas 3 veces de 50 μ L a 1 mL.

Anexo 12 Diluciones seriadas para aislar *Trichoderma harzianum*



a. Solución madre: 10 g de suelo en 90 mL de agua.



b. Toma de 9 mL de la disolución de uno de los tubos.



c. Colocación de 9 mL de solución en un tubo con 10 mL de agua destilada.



d. Dilución seriada de 10^{-1} a la 10^{-6}



e. Siembra en fonde de caja o Caja Pobre

Anexo 13. Preparación de la solución y conteo de UFC/mL



a. Preparación con suero fisiológico y Tween 80.



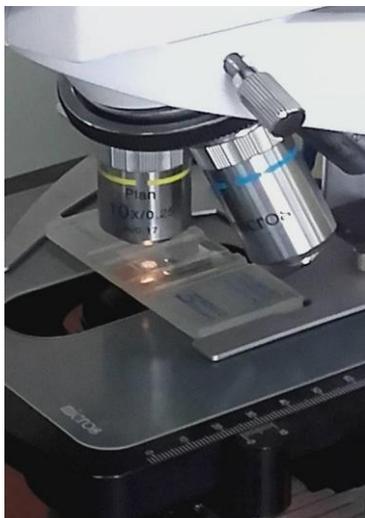
b. Materiales para la preparación de la solución fúngica.



c. Solución de hongo *T. harzianum*



d. Colocación de 50 μ L de solución en la Cámara de Neubauer



e. Observación en microscopio.



f. Cuadrantes de la Cámara de Neubauer

g. Conteo de esporas de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*

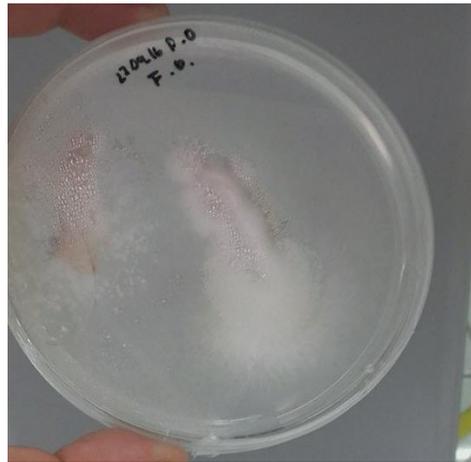
<i>Trichoderma harzianum</i>				
Días	Cuadrante arriba	Cuadrante abajo	Total	Número de células /mL
d1	540	627	1167	2,92E+07
d7	431	471	902	2,26E+07
d22	390	724	1114	2,79E+07
d38	737	893	1630	4,08E+07
d50	611	551	1162	2,91E+07
d53	447	500	947	2,37E+07
Cuadrados contados	10	PROMEDIO		2,88E+07
Valor fórmula*	250 000			
<i>Pleurotus ostreatus</i>				
Días	Cuadrante arriba	Cuadrante abajo	Total	Número de células /mL
d1	358	853	1211	3,03E+07
d7	317	483	800	2,00E+07
d22	492	625	1117	2,79E+07
d38	429	897	1326	3,32E+07
d50	580	553	1133	2,83E+07
d53	447	500	947	2,37E+07
Cuadrados contados	10	PROMEDIO		2,66E+07
Valor fórmula*	250 000			

Elaborado por: La autora, 2017.

Anexo 14. Siembra y resiembra de *Pleurotus ostreatus*



a. Siembra de las laminillas de en medio PDA.



b. Crecimiento de micelio alrededor del explante.



c. Resiembra de *P. ostreatus* y el micelio 7 cm de radio.



d. Crecimiento del hongo: 9 cm de diámetro.

Anexo 15. Preparación y aplicación del inóculo



- a. Cajas para la preparación del inóculos: 22 cajas para *Trichoderma harzianum* y 20 cajas para *Pleurotus ostreatus*.



- b. Preparación del inóculo en agua tibia.



- c. Inoculación del hongo.

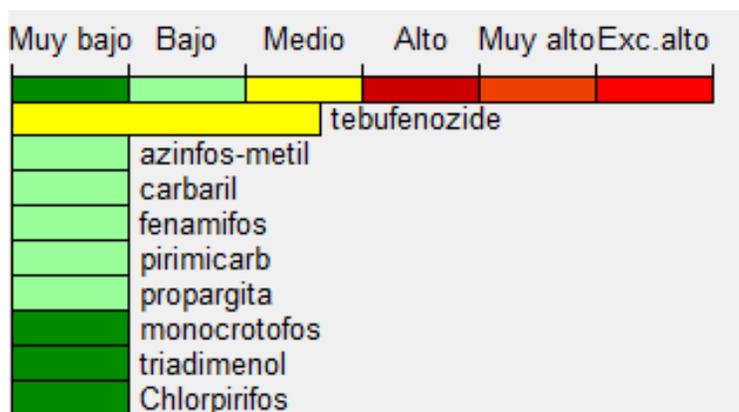
Anexo 16. Toxicidad y movilidad calculada por Csiro Piri Software

a. Insecticida Clorpirifos: Agua Subterránea (ASb) Impacto por Movilidad

Pesticida	Clorpirifos	Fenamifos
Dosis de aplicación del producto kg o L/ha	0.50000	20.00000
Fracción del ingrediente activo	0.48000	0.10000
Frecuencia de uso (tiempo/ periodo de interés)	1.00000	1.00000
Porcentaje del área tratada	100.00000	100.00000
Persistencia en el ambiente (días)	80.00000	80.00000
Koc (L/kg)	8151.00000	754.00000
LC50, trucha arcoíris (mg/L)	0.00200	0.00000e+000
Clasificación	Insecticida	Insecticida
Clasificación	0.00000e+000	80.00000
Monto de pesticida aplicado	0.24000	2.00000
Kd	118.47384	10.95930
Ajustado, Persistencia en el ambiente (días)	216.41665	2.29943
Health Advisory Limits (USEPA) (mg/L)	0.0200000	0.00200
ASb Potencial de contaminación (kg/ha) Solamente movilidad	0.00048	0.00400
ASb Potencial de contaminación (ppb) solamente movilidad	0.04800	0.40000
ASb Rango de Movilidad únicamente	Muy Bajo	Bajo

Nota: Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

a.1 Barra colorimétrica: Agua Subterránea (ASb) Impacto por Movilidad



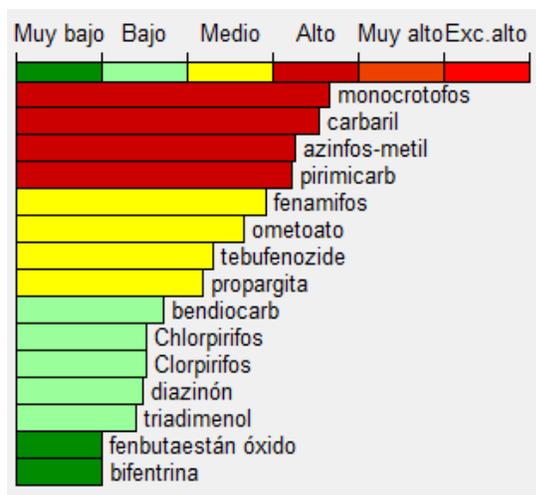
Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

b. Insecticida Clorpirifos: Agua Superficial (AST): Impacto por Movilidad

Pesticida	Clorpirifos	Fenamifos
Dosis de aplicación del producto kg o L/ha	0.50000	20.00000
Fracción del ingrediente activo	0.48000	0.1000
Frecuencia de uso (tiempo/ periodo de interés)	1.00000	1.00000
Porcentaje del área tratada	100.00000	100.00000
Persistencia en el ambiente (días)	80.00000	0.85000
Koc (L/Kg)	8151.00000	754.00000
LC50, trucha arcoíris (mg/L)	0.00200	0.00000e+000
Clasificación	Insecticida	Insecticida
Clasificación	0.00000e+000	80.00000
Monto de pesticida aplicado	0.24000	2.00000
Kd	118.47384	10.95930
Ajustado, Persistencia en el ambiente (días)	216.41665	2.29943
Health Advisory Limits (USEPA) (mg/L)	0.0200000	0.00200
Capa de erosión	0.00283	0.00065
Número de días desde la aplicación del pesticida	1.00000	1.00000
Fracción que permanece en el suelo	0.99487	0.61620
AS escorrentía (mm)	5.18553	5.18553
Fracción de escorrentía	0.00255	0.01575
Fracción de migración lejos del cuerpo de agua	0.00000e+000	1.94113e-005
Fracción de migración en la superficie del cuerpo de agua	0.00000e+000	7.99828e-006
AS PP*100, Movilidad únicamente	0.01290	0.32817
AS Tasa de movilidad únicamente	Bajo	Medio

Nota: Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

b.1 Barra colorimétrica del Agua Superficial (AST): Impacto por Movilidad



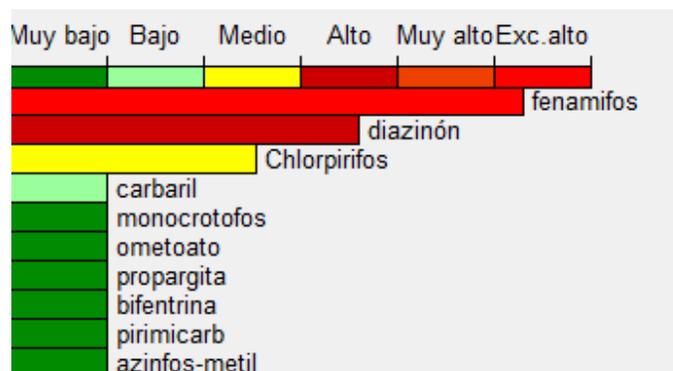
Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

c. Insecticida Clorpirifos y Fenamifos: Agua Subterránea (ASb) Impacto de la toxicidad Comparación Health Advisory Limits (USE EPA) (mg/L)

Pesticida	Clorpirifos	Fenamifos
Dosis de aplicación del producto Kg o L/Ha	0.50000	20.00000
Fracción del ingrediente activo	0.48000	0.10000
Frecuencia de uso (tiempo/ periodo de interés)	1.00000	1.00000
Porcentaje del área tratada	100.00000	100.00000
Persistencia en el ambiente (días)	80.00000	85.00000
Koc (litros/Kg)	8151.00000	754.00000
LC50, trucha arcoíris (mg/L)	0.00200	0.00000e+000
Clasificación	Insecticida	Insecticida
Clasificación	0.00000e+000	80.00000
Monto de pesticida aplicado	0.24000	2.00000
Kd	118.47384	10.95930
Ajustado, Persistencia en el ambiente (días)	216.41665	2.29943
Health Advisory Limits (USEPA) (mg/L)	0.0200000	0.00200
Rango de recargo (mm/año)	68.64521	69.64521
Fracción de pesticida en suela-agua	0.00243	0.02425
Ajustado Fracción de pesticida en sueño-agua	0.00243	0.02425
Media de tiempo de residencia (días) a través del perfil	43070.97806	4311.39453
Media de la velocidad descendente (mm/año)	0.00522	0.05219
Factor de atenuación	0.00200	0.00200
Carga de agua subterránea	12.0000	1000.00000
ASb Potencial de contaminación (kg/ha)	0.02400	2.00000
ASb Potencial de contaminación (ppb)	2.40000	200.0000
Asb Rango	Medio	Exc. Alto

Nota: Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

c.1 Barra colorimétrica: Agua Subterránea (ASb) Impacto de la toxicidad Comparación Health Advisory Limits (USE EPA) (mg/L)



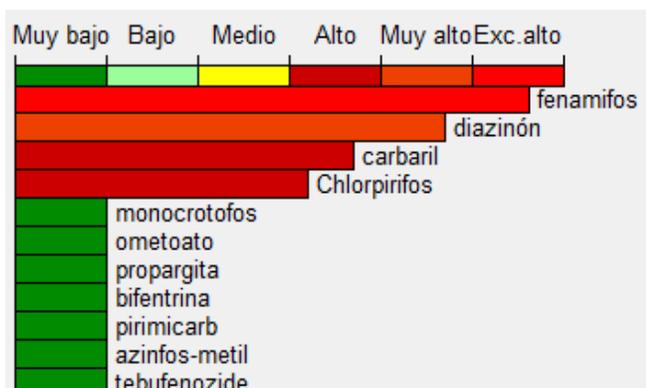
Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

d. Insecticida Clorpirifos y Fenamifos: Agua Superficial (AST) Impacto de la toxicidad Comparación Health Advisory Limits (USE EPA) (mg/L)

Pesticida	Clopírifos	Fenamifos
Dosis de aplicación del producto kg o L/ha	0.50000	20.00000
Fracción del ingrediente activo	0.48000	0.10000
Frecuencia de uso (tiempo/ periodo de interés)	1.00000	1.00000
Porcentaje del área tratada	100.00000	100.00000
Persistencia en el ambiente (días)	80.00000	0.85000
Koc (litros/Kg)	8151.00000	754.00000
LC50, trucha arcoíris (mg/L)	0.00200	0.00000e+000
Clasificación	Insecticida	Insecticida
Clasificación	0.00000e+000	80.00000
Monto de pesticida aplicado	0.24000	2.00000
Kd	118.47384	10.95930
Ajustado, Persistencia en el ambiente (días)	216.41665	2.29943
Health Advisory Limits (USEPA) (mg/L)	0.0200000	0.00200
Capa de erosión	0.00283	0.00065
Número de días desde la aplicación del pesticida	1.00000	1.00000
Fracción que permanece en el suelo	0.99487	0.61620
AS escorrentía (mm)	5.18553	5.18553
Fracción de escorrentía	0.00255	0.01575
Fracción de migración lejos del cuerpo de agua	0.00000e+000	1.94113e-005
Fracción de migración en la superficie del cuerpo de agua	0.00000e+000	7.99828e-006
Carga de agua superficial	12.00000	1000.00000
Agua superficial potencial de contaminación * 100	0.64508	164.08346
AS Rango	Alto	Exc. Alto

Nota: Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

d.1 Barra Colorimétrica: Agua Superficiales (AST) Impacto de la toxicidad Comparación Health Advisory Limits (USE EPA) (mg/L)



Fuente: (Csiro Piri Software, 2017)

Anexo 17. Análisis de laboratorio

a. Análisis de compuestos organofosforados Método EPA 8141: CENTROCESAL Cía. Ltda.



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cía. Ltda.**

ÁREA QUÍMICA

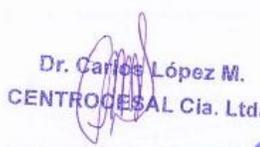
INFORME DE ENSAYO No.: 20587-01-24-01-17-Q

Cliente: LAURA ELIZABETH HUACHI ESPIN	
Representante: Laura Huachi	
Dirección: La Kennedy	
Teléfono: 2401712/ 0999016236	FAX:
Identificación de la Muestra: PAPA	
Descripción de la Muestra: sólido color blanco	
Contenido declarado: 500g	
No. Lote o código: NA	
Fecha de elaboración: NA	
Fecha de caducidad: NA	
Conservación de la Muestra: Ambiente	
Muestreo: Por el cliente	Fecha de toma de muestra: NA
	Fecha de recepción: 24-ene.-2017
	Fecha de ensayo: 25-27-Ene-2017
	Fecha de reporte: 7-feb.-2017

Resultados analíticos: Pag.: 1 de 2

ANÁLISIS DE COMPUESTOS
ORGANOFOSFORADOS
MÉTODO EPA 8141

Compuesto analizado	PAPA ug/Kg
Acefato	<0.02
Clofórfos	0.82
Diazinon	<0.02
Dimetoato	<0.02
Etil-Paration	<0.02
Malation	<0.02
Metamidofos	<0.02
Monocrotofos	<0.02
Profenofos	<0.02
Triclorfon	<0.02



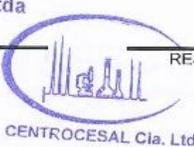
Dr. Carlos López M.
CENTROCESAL Cía. Ltda

RESPONSABLE DE ANÁLISIS



BQ.F Raquel Rosas R.
CENTROCESAL Cía. Ltda

RESPONSABLE DE SUPERVISIÓN



CENTROCESAL Cía. Ltda.

Notas:
ND: No declara
NA: No aplica

NOTA 1: Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
NOTA 2: Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.
NOTA 3: Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
NOTA 4: La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.
NOTA 5: Las opiniones/interpretaciones/etc., que se puedan indicar, están FUERA del alcance de acreditación del SAE.
NOTA 6: El tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio, corresponde a perecibles: 48 horas y no perecibles: 30 días contados desde que se entrega el resultado.

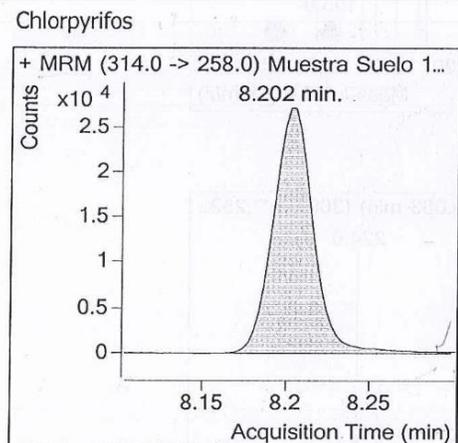
Ref.:POE.S.10.1 Rev.:07 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América N31-932 y Av. Ataruna de Jesús
Telfs: (503 2) 2230342 / 2233792
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872
e-mail: info@centrocesal.com
www.centrocesal.com
QUITO - ECUADOR

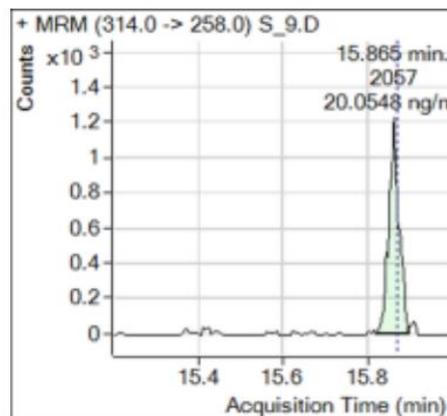
101

b. Cromatogramas de la primera muestra de suelo analizadas aplicando el Método de QUECHERS



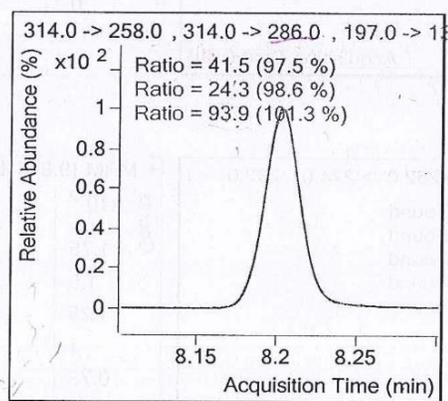
Fuente: (LMEER, 2017)

a. Primer pico detectado por el cromatógrafo cuyo tiempo de retención es de 8.202 min.



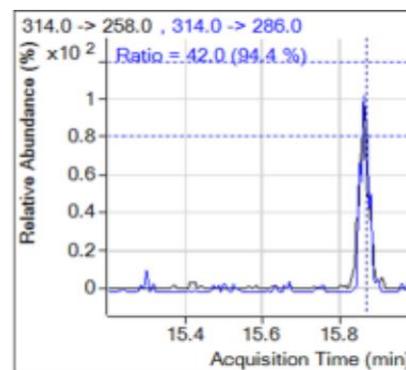
Fuente: (Mai, Ninga, Cara, & Mukaj, 2016)

c. Primer pico detectado por el cromatógrafo cuyo tiempo de retención es de 15.865 min.



Fuente: (LMEER, 2017)

b. Los tres ratios detectados que se originan del primer pico. El que presenta mayor abundancia relativa en un tiempo de retención de 8.202 min. es 101.3%.



Fuente: (Mai, Ninga, Cara, & Mukaj, 2016)

d. Los tres ratios detectados que se originan del primer pico. El que presenta mayor abundancia relativa en un tiempo de retención de 15.865 min. es 94.4%.

b.1 Cromatografía de gases aplicado a masas (GC/MS)

La primera muestra de suelo de cultivo de papa analizada por el Laboratorio de Ministerio de Energía y Recursos Renovables, indica que el tiempo de retención del analito (t_R) en el cual se detecta Clorpirifos es de 8.202 min con una concentración de 180 ng/mL y un área de 45061Hz. Este tiempo de retención se acerca al dato obtenido por (Batta, Zatar, & Sama'negh, 2005) al muestrear hojas de un cultivo de uvas donde el t_R fue de 9.709 min. En esta muestra también se presentan los tres ratios obtenidos que se establecen mediante la relación entre la abundancia relativa (%) y el tiempo de retención (min) en los cuales, el ratio 3 indica que es posible se presente en un 101.3% más que el ratio 1: 97.5% y el ratio 2: 98.06% en ese mismo t_R . Esta concentración es baja y se debe considerar la fase del cultivo en la que se realizó la recolección de las muestras ya que al ser post-cosecha el empleo de estos agroquímicos disminuye. Es importante considerar los valores de los QIon mismos que se seleccionan del compuesto diana de un espectro de masas los cuales permiten corroborar al compuesto identificado que en el caso del presente ensayo es Clorpirifos (Agilent Technologies, 2014). En el análisis el OIon fue de 314 del cual se derivaron dos iones más de 258 y 286. Esta información se corrobora con la obtenida por (Sánchez-Brunette, Albero, Martín, & Tadeo, 2005) donde al evaluar Clorpirifos, entre otros insecticidas, el valor de QIon también fue de 314 pero sin identificarse los ratios que se derivan de este.

Según el estudio realizado por (Mai, Ninga, Cara, & Mukaj, 2016) sobre la determinación de Clorpirifos en lechuga por GC/MS/MS se puede comprobar los datos obtenidos en la primera muestra analizada y confirmar que el pico detectado es del insecticida en cuestión. En el caso de la lechuga se detectó el primer analito en un t_R de 15.865 min identificándose

el QIon de 314 y los iones derivados de este de 258 y 286 a una concentración de 20.0548 ng/mL. Sin embargo, en este caso sólo se detectó un ratio el cual puede encontrarse a un 94.4% en ese mismo tiempo. El t_R varía dependiendo del compuesto. Por ejemplo, en el caso del Metil-clorpirifos el t_R es de 19.8 min y sus iones característicos son: 237,263 y 345 (Alvesi, y otros, 2012). Esta información difiere de los datos obtenidos para Clorpirifos ya que el t_R es mayor y presenta 3 iones característicos que son diferentes de los del IOP objetivo de estudio.

El insecticida Clorpirifos fue de 18.100 min, 4043.38 $\mu\text{g/g}$ y un área detectada de 1570903 Hz. Las áreas permiten definir la concentración en la cual se encuentra la muestra de un insecticida. En esta ocasión el t_R al que fue detectado es mucho mayor que en el primer caso. De igual manera la concentración y la velocidad es mucho mayor. Esto posiblemente se debió a que la muestra analizada estuvo muy concentrada y por ende el analito demoró en pasar por la columna y ser detectado. Por ello, antes de realizar el análisis es importante conocer la concentración del insecticida que se va a aplicar y en qué cantidad de suelo, matriz u otro producto se va a realizar el ensayo ya que a partir de ellos, se puede conocer tentativamente la concentración a la cual saldrá y permite identificar a tiempo si se deben o no hacer diluciones para que esto facilite su detección.

Las últimas muestras analizadas, una vez culminadas las inoculaciones de los hongos, expresaron un tiempo de retención comprendido entre 18.100 y 18.114 min. Al ser los tratamientos y las repeticiones elaborados con el suelo inoculado con el insecticida se esperaba que salgan en el mismo tiempo, lo cual se corrobora. El T3 que fue el mejor tratamiento presentó tiempos de retención similares: T3R1 (18.114 min), T3R2 (18.102

min), T3R3 (18.101 min) y el T3R4 (18.100 min) que se encuentran dentro de los datos obtenidos por los autores mencionados anteriormente. Las áreas de los picos, considerando todas las repeticiones, van de 100871 Hz (T0R1) a 9995541Hz (T0R4). Tomando en cuenta al mejor tratamiento del ensayo, el T3, está entre 53717.8 (T3R2) a 66553.3 (T3R4).

En el estudio realizado por (Mai, Ninga, Cara, & Mukaj, 2016) en el cual también realizó la aplicación de Clorpirifos a un cultivo de lechuga, indica que se llevó a cabo en un invernadero pero las concentraciones del insecticida que se consideraron fueron dos: a 0.1% y a 0.075%. Además se analizaron cada 5 días durante un periodo de 21 días y también las muestras fueron evaluadas a través de un GC/MS. Las concentraciones obtenidas son mayores al LMR (Límites máximos de Residuos): 0.05mg/Kg. Al ser mayor la concentración la molécula no se disipa con facilidad por lo que está en contacto con el producto más tiempo y este se incorpora a la lechuga, acumulándose en ella. En el estudio realizado por (Benítez-Díaz, Miranda-Contreras, Molina-Morales, Sánchez-Gil, & Balza-Quintero, 2015) el LMR para la papa es de 2 mg/kg pero en el caso de estudio la concentración obtenida es menor a la establecida: 0.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ que en las unidades de medida del LMR es 0.00082 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pero respecto a los otros organofosforados encontrados y mencionados anteriormente, es alta. En el análisis realizado de plaguicidas en el recurso agua de la zona la concentración de Clorpirifos se encuentra por debajo del límite de cuantificación. Otros insecticidas organofosforados como el Fenamifos y el Profenofos están por debajo del límite de detección. Los límites de cuantificación establecidos en agua para Clorpirifos es de 0.003 $\mu\text{g}/\text{g}$, para Fenamifos es de 0.006 $\mu\text{g}/\text{g}$ y para Profenofos es de 0.006 μg , y los límites de detección para los tres insecticidas son

más bajos para Clorpirifos es de 0.001 $\mu\text{g/g}$, Profenofos es de 0.002 $\mu\text{g/g}$ y para Fenamifos es de 0.002 $\mu\text{g/g}$. En el suelo la concentración es mayor que en el agua: Chlorpirifos presenta 0.084 $\mu\text{g/g}$, Fenamifos tiene 0.914 $\mu\text{g/g}$ y Profenofos es de 0.0075 $\mu\text{g/g}$ (*Ver anexo 17, literal g*).

Finalmente, la textura del suelo no varió y mantuvo en porcentajes cercanos a los obtenidos en un primer momento. En arena de 78 a 64%, en limo de 20 a 22% y en arcilla de 2 a 14%. La textura del suelo no varía, de hecho concuerda con el dato obtenido en el Programa Csiro Piri Software.

c. Análisis cuantitativo de plaguicidas en la muestra de suelo.

Componentes	Tiempo de retención	Q ion	Response	Concentración	Unidades	Q value
Carbofurán	6,183	164.0 ---149.0	576	0	ng/ml	65
Cholpirifos	8,202	314.0---258.0	45061	180,85	ng/ml	99
Profenofos	9,755	206.0---142.0	174	178,59	ng/ml	90
Propiconazole	11,251	259.0---173.0	293	140,11	ng/ml	94
Bifenthrin	12,132	181.0---166.0	1792	191,24	ng/ml	89
Cyhalothrin	13,09	181.0---127.0	433	117,64	ng/ml	1
PCB 198	13,086	430.0---395.0	896	69,15	ng/ml	97
Azoxystrobin	16,564	344.0---329.00	2001	557,68	ng/ml	96

Fuente: (LMEER, 2017)

Elaborado por: La autora, 2017.

d. Análisis Físico-Químico del suelo inicial (I) y final (F)

pH		C.E.		M.O.		N-TOTAL		P		K		Ca		Mg		Na		S	
μds		Ms/cm		%		%		ppm		meq/100g		meq/100g		meq/100g		meq/100g		ppm	
I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
5.80 (B)	6.12 (B)	1.33 (ok)	1.14 (ok)	2.50 (B)	3.71 (ok)	3.71 (B)	0.19 (ok)	25.7 (ok)	1.11 (B)	1.36 (ok)	3.07 (A)	12.17 (ok)	6.18 (ok)	3.98 (ok)	3.17 (ok)	0.17 (ok)	0.26 (ok)	6.20 (B)	67.92 (ok)
B		Fe		Mn		Cu		Zn		RELACIONES								CICE	
mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		Fe/Mn		Ca/Mg		Mg/K		Ca+Mg/K		meq/100g	
I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
1.15 (ok)	0.15 (B)	76.64 (ok)	405.86 (A)	15.23 (ok)	90.40 (A)	4.40 (ok)	14.25 (A)	246.5 (A)	9.80 (ok)	5.03 (A)	4.49 (B)	3.06 (ok)	1.67 (B)	2.93 (ok)	1.21 (B)	35.70 (A)	7.48 (ok)	17.68 (ok)	13.22 (ok)
TEXTURA (%)																			
Arena		Limo		Arcilla															
I	F	I	F	I	F														
76	64	16	22	8	14														
FRANCO ARENOSO																			

Nota: *A: alto/ *B: Bajo/*OK: Adecuado

mg/L: miligramos por litro; meq/100g: miliequivalente por cien gramos

usd: unidades

Elaborado por: (Laboratorio de suelos y agua-Cayambe, 2016)

e. Cromatograma concentración inicial de Chlorpirifos

Data File D:\SC6890\DATOS\CALIBARO\17021506.D

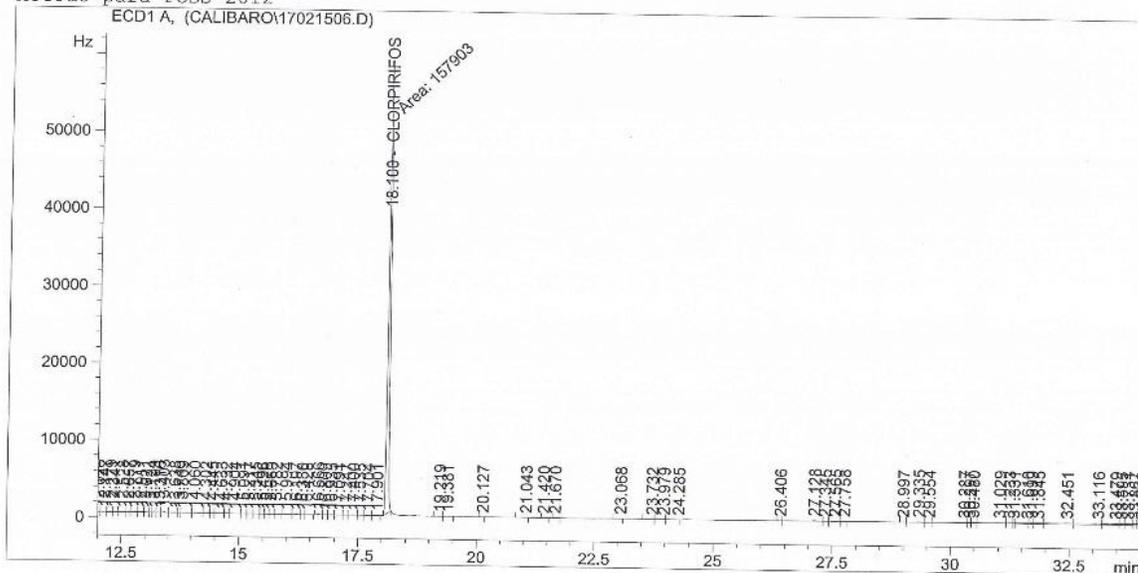
Sample Name: MUESTRA INICIAL

Analisis de Clorpirifos, 1. Dilucion (50ul de muestra l
levados a 1ml), 2. Dilucion (50ul llevados a 1ml). 3. D
ilucion (50ul de muestra llevados a 1ml) Analisis GC.

```

=====
Injection Date : 2/15/2017 1:34:08 PM      Seq. Line : 6
Sample Name    : MUESTRA INICIAL           Location  : Vial 18
Acq. Operator  : BT                       Inj      : 1
                                                Inj Volume: 2 µl

Method         : D:\SC6890\METODOS\CLOPPF17.M
Last changed  : 2/8/2017 8:06:44 AM by BT
Metodo para PCBs 2012
    
```



External Standard Report (Sample Amount is 0!)

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 2/8/2017 8:06:39 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

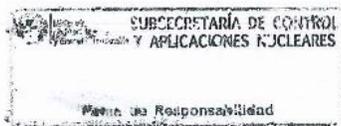
Signal 1: ECD1 A,

RetTime [min]	Type	Area [Hz*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
18.100	MM	1.57903e5	9.91580e-7	1.56573e-1		CLORPIRIFOS

Totals : 1.56573e-1

Results obtained with enhanced integrator!

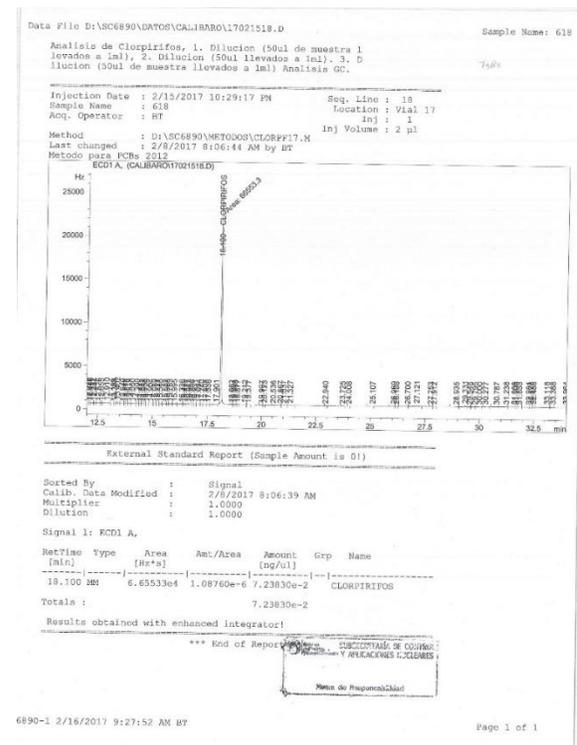
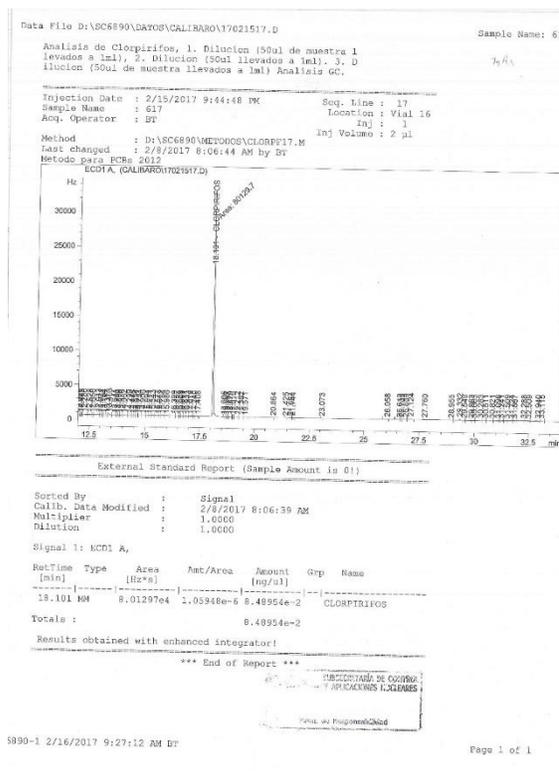
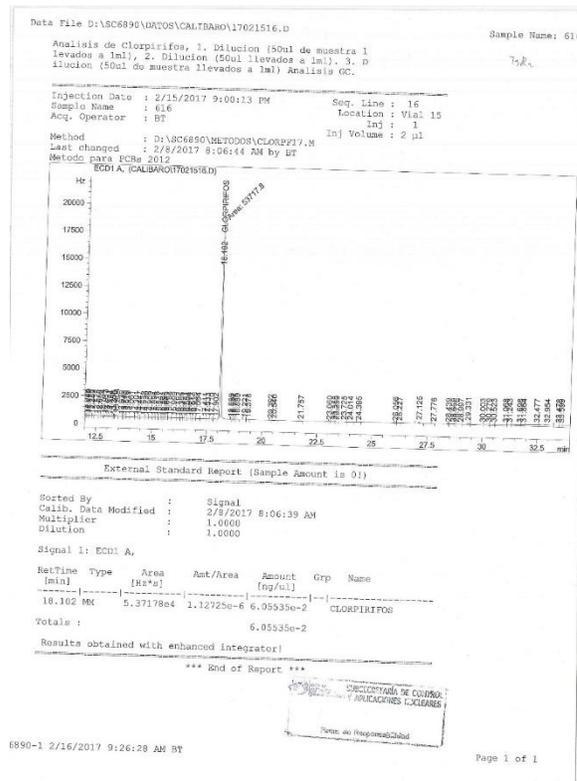
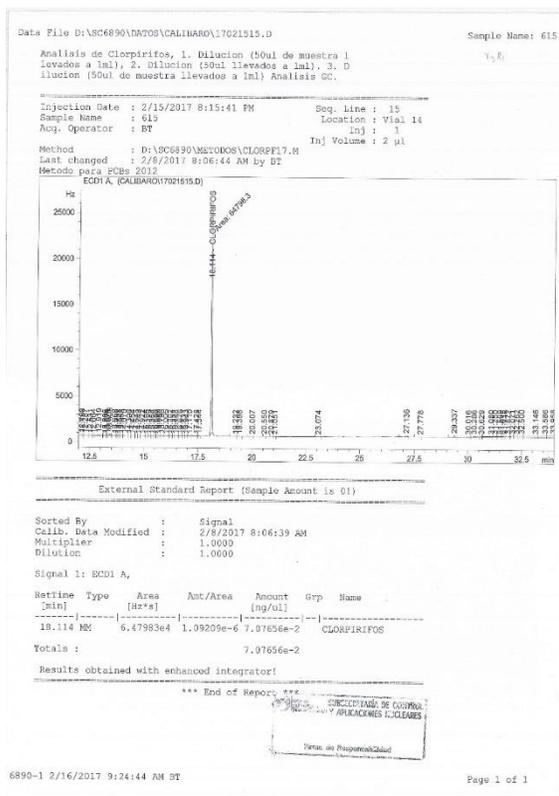
*** End of Report ***



6890-1 2/16/2017 9:10:57 AM BT

Page 1 of 1

f. Cromatogramas de las repeticiones del Tratamiento 3 (T3): Suelo con insecticida más *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatu*



g. Límite de cuantificación y detección en agua

Insecticidas Organofosforados en Agua y suelo		
Insecticidas	Agua ($\mu\text{g/g}$)	Suelo ($\mu\text{g/g}$)
Clorpirifos	<LC	0.084
Fenamifos	<LD	0.914
Profenofos	<LD	0.0075
Límite de cuantificación Límite de detección sólo en muestra de agua		
Insecticidas	Límite de Cuantificación en agua ($\mu\text{g/g}$)	Límite de Detección en agua ($\mu\text{g/g}$)
Clorpirifos	0.003	0.001
Fenamifos	0.006	0.002
Profenofos	0.006	0.002

Fuente: (LMEER, 2017)

Elaborado por: La autora, 2017.

Anexo 18. Crecimiento de *Trichoderma harzianum* a los 5 días



a. *Trichoderma harzianum* de color blanco y verde pálido



b. *Trichoderma harzianum* de color verde oscuro empezando a crecer.



c. *Trichoderma harzianum* visto por el envés de la caja.

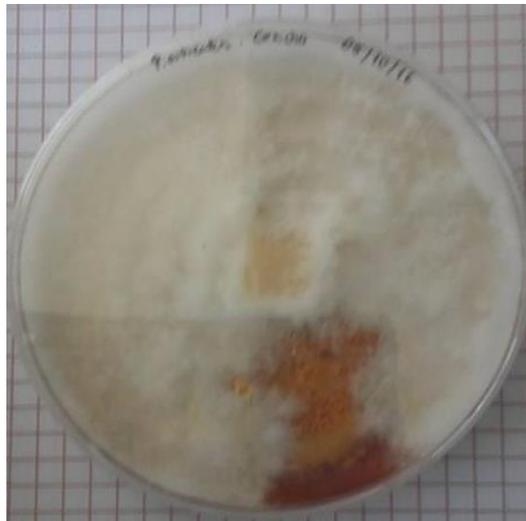


d. *Trichoderma harzianum* cuyo crecimiento se toma 9 cm de diámetro cubriendo la caja Petri por completo.

Anexo 19. Exudado de sustancias aceitosas y amarillentas de *P. ostreatus*



a. Formación inicial de los exudados en la superficie de *Pleurotus ostreatus* de color amarillo a naranja.



b. Formación avanzada de exudados de *Pleurotus ostreatus* cuya coloración va de naranja fuerte a rojo marrón.

