

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

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

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE UN INSECTICIDA
CARBAMATO EN MUESTRA DE SUELO DE CULTIVO DE PAPA,
MEDIANTE *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.**

AUTORA:

MICHELLE KATHERINE PAREDES SANDOVAL

TUTORA:

LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Quito, Marzo de 2017

Cesión de derechos de autor

Yo, Michelle Katherine Paredes Sandoval, con documento de identificación N° 1750005736, 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 carbamato en muestra 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 ingeniería 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.



Michelle Katherine Paredes Sandoval

CI: 1750005736

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Evaluación de la biodegradación de un insecticida carbamato en muestra de suelo de cultivo de papa, mediante *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*” realizado por Michelle Katherine Paredes Sandoval, 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, 2017



Laura Elizabeth Huachi Espín

1711113744

Dedicatoria

La presente investigación, va dedicada primeramente a Dios por ser la luz y guía de mi vida.

A mis padres y familia que con su dedicación y apoyo han forjado en mis valores y principios de superación y sencillez en todo momento.

Agradecimientos

Me complace en agradecer, a mi directora de tesis y maestra Laura Huachi por su asesoramiento, motivación, responsabilidad, aportaciones valiosas a mi trabajo y constancia académica en el transcurso de este proceso; que han sido fundamentales para el desarrollo de mi investigación y formación.

De igual forma a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Laboratorio de suelos de Cayambe, Laboratorios de Comisión de Energía atómica, que han permitido y facilitado la fase de laboratorio.

Un agradecimiento especial a Biól. Luis Baquero, Quím. Ramiro Castro, Ing. Ilda Chica, Ing. Janss Beltrán, Ing. Marco Ibarra, Ing. Erika Paredes por las sugerencias, recomendaciones y aportaciones brindadas, que fueron valiosas para continuar con mi trabajo investigativo.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Introducción | 1 |
| Capítulo 1: Marco conceptual..... | 6 |
| 1.1 Plaguicidas o pesticidas | 6 |
| 1.1.1 Carbamatos..... | 7 |
| a) Propiedades y usos | 8 |
| b) Modo de acción | 8 |
| c) Transformación metabólica | 9 |
| d) Transporte en el ambiente | 10 |
| e) Efectos | 10 |
| 1.2 Biorremediación | 11 |
| 1.2.1 Micoremediación | 12 |
| 1.2.1.1 <i>Trichoderma harzianum</i>..... | 14 |
| a) Características macroscópicas del micelio | 15 |
| b) Características microscópicas del micelio..... | 15 |
| c) Requisitos para crecimiento | 15 |
| d) Mecanismos de acción..... | 16 |
| e) Rutas metabólicas para carbofurán..... | 16 |
| 1.2.1.2 <i>Pleurotus ostreatus</i> | 18 |
| a) Características macroscópicas del micelio | 19 |
| b) Características microscópicas del micelio..... | 19 |
| c) Requisitos para crecimiento | 19 |
| d) Mecanismos de acción..... | 20 |
| e) Rutas metabólicas para carbofurán..... | 22 |
| 1.3 Pesticide Impact Rating Index (PIRI) software – CSIRO | 24 |
| Capítulo 2: Metodología | 25 |

| | |
|--|----|
| 2.1 Localización | 25 |
| • Suelo del cultivo de papa..... | 25 |
| • <i>P. ostreatus</i> | 26 |
| • Ensayo de biorremediación | 26 |
| 2.2 Fase de Campo | 27 |
| 2.2.1 Georreferenciación | 27 |
| 2.2.2 Muestras, transporte y almacenamiento | 27 |
| a) Suelos de cultivo de papa | 27 |
| b) Agua | 27 |
| c) <i>P. ostreatus</i> | 28 |
| 2.2.3 Construcción de terrario aclimatizado | 28 |
| 2.2.4 Inoculación del insecticida | 28 |
| 2.2.5 Diseño experimental e implementación del ensayo | 28 |
| 2.2.6 Tratamientos | 29 |
| 2.2.7 Aplicación del inóculo micelial | 29 |
| 2.2.8 Variables de medición | 30 |
| 2.3 Fase de Laboratorio | 30 |
| 2.3.1 Análisis físico químico de suelo | 30 |
| 2.3.2 Análisis químico analítico | 31 |
| a) Agua | 31 |
| b) Suelo | 31 |
| 2.3.3 Preparación de medios de cultivo | 32 |
| 2.3.4 Técnicas Microbiológicas. | 32 |
| a) Aislamiento de <i>T. harzianum</i> | 32 |
| b) Aislamiento de <i>P. ostreatus</i> | 34 |
| 2.3.5 Preparación del inóculo de hongos | 35 |
| Capítulo 3: Resultados y Discusión | 36 |
| 3.1 Diagnóstico del terreno del cultivo de papa. | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 Aislamiento de hongos | 39 |
| a) <i>T. harzianum</i> | 39 |
| b) <i>P. ostreatus</i> | 41 |
| 3.3 Variables medidas | 43 |
| a) Concentraciones de carbofurán..... | 43 |
| b) Temperaturas | 46 |
| c) Humedad | 48 |
| d) Potencial de hidrógeno (pH)..... | 50 |
| Conclusiones | 52 |
| Recomendaciones | 53 |
| Bibliografía | 54 |
| ANEXOS | 67 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Clasificación de plaguicidas | 6 |
| Tabla 2: Toxicidad de plaguicidas en función de DL50. | 7 |
| Tabla 3: Estructura química de Ácido Carbámico | 8 |
| Tabla 4: Etapas y parámetros de crecimiento para <i>T.harzianum</i> | 16 |
| Tabla 5: Parámetros de etapas de crecimiento para <i>P.ostreatus</i> | 19 |
| Tabla 6: Descripción de tratamientos..... | 29 |
| Tabla 7: Parámetros físicos y químicos. | 30 |
| Tabla 8: Movilidad y toxicidad de carbofurán según PIRI. | 36 |
| Tabla 9: Características macroscópicas del haz y envés de <i>T. harzianum</i> | 39 |
| Tabla 10: Características microscópicas de <i>T. harzianum</i> | 40 |
| Tabla 11: Características macroscópicas del haz y envés de la caja petri por <i>P. ostreatus</i> | 41 |
| Tabla 12: Características microscópicas de <i>P. ostreatus</i> | 42 |
| Tabla 13: Concentraciones promedio, CV y rangos de significancia. | 43 |
| Tabla 14: Temperaturas promedio, CV y rangos de significancia..... | 46 |
| Tabla 15: Humedades promedio, CV y rangos de significancia..... | 48 |
| Tabla 16: Potencial de hidrogeno promedio, CV y rangos de significancia..... | 50 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Ley cinética de primer orden para la degradación de insecticidas | 14 |
| Figura 2: Hidrólisis de esteres carboxílicos | 17 |
| Figura 3: Biodegradación de Carbofurán | 18 |
| Figura 4: Mecanismos enzimáticos de <i>P. ostreatus</i> | 21 |
| Figura 5: Ruta metabólica de peroxidasas lignolíticas LiP y MnP | 22 |
| Figura 6: Reacciones de Fase I para N-metilcarbamatos | 23 |
| Figura 7: Ubicación del cultivo de papa. | 25 |
| Figura 8: Ubicación del muestreo de <i>P. ostreatus</i> | 26 |
| Figura 9: Ubicación del ensayo | 26 |
| Figura 10: Diseño del ensayo | 29 |

Índice de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1: Muestreo del suelo y agua del cultivo de papa..... | 67 |
| Anexo 2. Muestreo de <i>P.ostreatus</i> | 69 |
| Anexo 3: Montaje del diseño experimental | 70 |
| Anexo 4: Metodologías aplicadas | 72 |
| Anexo 5: Análisis químico analítico de suelo..... | 75 |
| Anexo 6: Elaboración de medios de cultivo | 76 |
| Anexo 7: Aislamiento de <i>T. harzianum</i> | 77 |
| Anexo 8: Aislamiento de <i>P.ostreatus</i> | 79 |
| Anexo 9: Diagnóstico obtenido por PIRI..... | 81 |
| Anexo 10: Resultados | 86 |

Glosario

- Quimiolitótrofos: Son organismos autótrofos que utilizan CO_2 como fuente de carbono; obtienen energía por oxidación de compuestos inorgánicos reducidos como: NH_4^+ , NO_2^- , H_2 y formas reducidas de azufre (H_2S , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) (Stanier, Ingraham, Wheelis, & Painter, 1992).
- Hongos Ligninolíticos: Son organismos que crecen en la madera y juegan un papel esencial en el ciclo del carbono, se relaciona con la degradación de lignina basados en la producción de radicales libres, principalmente por medio de las enzimas extracelulares lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa (Torres, Bernal, Rosa, & Vázquez-Duhalt, 2001).
- Cometabolismo: Degradación simultánea de dos compuestos orgánicos en la que la degradación de uno depende de la presencia del otro (García-Riviero & Peralta, 2008) .
- Conidioforos: Hifa sobre la cual se originan los conidios (Universidad Nacional Autónoma de México, 2016).
- Hongos anamórficos: Son organismos que generan esporas asexuales por mitosis, cuya forma es muy variable (Carrillo & Audisio, 2007).
- Fiálide: Célula conidiógena, habitualmente en forma de botella, en la que se produce una serie de conidios blásticos (fialoconidios) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2016).
- Enzimas quitinólíticas: Son enzimas con propiedades antifúngicas, dado que las quitinasas pueden hidrolizar la quitina presente en la pared celular de los hongos, pudiendo inhibir el crecimiento de los mismos, e incluso provocando la lisis celular (Sieria, 2013).

Resumen

Esta investigación tiene como finalidad evaluar la biodegradación del insecticida carbofurán mediante la biorremediación de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus* en muestras de suelo de cultivo de papa.

El procedimiento metodológico, se realizó en dos fases: la fase de campo consistió en la georreferenciación y muestreo de suelo del cultivo de papa en “El Capulí” Carchi; el muestreo de *Pleurotus ostreatus* fue en Calacalí, además se realizó un terrario aclimatizado para su crecimiento. La fase de laboratorio consistió en el análisis fisicoquímico al inicio y final del proyecto de nutrientes del suelo, plaguicidas por HPLC; el aislamiento de *T. harzianum* en base al suelo del cultivo de papa y el aislamiento de *P. ostreatus* a partir de cuerpos fructíferos (sombbrero); fueron obtenidos por técnicas microbiológicas. Se aplicó un diseño completo al azar (DCA) con 4 repeticiones, 4 tratamientos y 16 unidades experimentales. Los tratamientos en mención fueron T0 (Suelo con insecticida), T1 (Suelo con insecticida y *Trichoderma harzianum*), T2 (Suelo con insecticida y *Pleurotus ostreatus*) y T3 (Suelo con insecticida mas *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*).

El tratamiento T1, cuya concentración del inóculo de *Trichoderma* utilizada fue de 38.3×10^6 conidias/mL de solución; resultó ser el mejor con un 63% de biodegradación que corresponde a 4170.5 $\mu\text{g/g}$ de carbofurán en 57 días. Así la bioaumentación de conidias presenta una alternativa para biodegradar moléculas recalcitrantes, difíciles de romper por procesos físico químicos. Esta técnica biológica presenta una opción debido a que la economía y el impacto ambiental son bajos.

Palabras clave: Biodegradación, carbofurán, papa, *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.

Abstract

This research aims to evaluate the biodegradation of the carbofuran insecticide by bioremediation of the fungi *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus ostreatus* in soil samples from potato cultivation.

The methodological procedure was carried out in two phases: the field phase consisted of georeferencing and soil sampling of the potato crop in "El Capulí" Carchi; the sampling of *Pleurotus ostreatus* was in Calacalí, in addition an aquarium was acclimatized for its growth. The laboratory phase consisted in the physicochemical analysis at the beginning and end of the project of soil nutrients, pesticides by HPLC; the isolation of *T. harzianum* based on the soil of potato cultivation and the isolation of *P. ostreatus* from fungal fruiting (cap); were obtained by microbiological techniques. A randomized complete design (DCA) was applied with 4 replicates, 4 treatments and 16 experimental units. The mentioned treatments were T0 (Soil with insecticide), T1 (Soil with insecticide and *Trichoderma harzianum*), T2 (Soil with insecticide and *Pleurotus ostreatus*) and T3 (Soil with insecticide plus *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus ostreatus*).

The T1 treatment, whose *Trichoderma* inoculum concentration used was 38.3×10^6 conidia/mL solution; proved to be the best with 63% biodegradation corresponding to 4170.5 $\mu\text{g/g}$ of carbofuran in 57 days. Thus the bioaugmentation of conidia presents an alternative to biodegrade recalcitrant molecules, difficult to break by physical-chemical processes. This biological technique presents an option because the economy and the environmental impact are low.

Keywords: Biodegradation, Carbofuran, potato, *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus ostreatus*.

Introducción

En el Ecuador el sector agropecuario es uno de los sistemas más importantes debido al impacto que ocasiona en ámbitos económicos y sociales del país. La protección hacia este sector se vincula con la aplicación de plaguicidas; 1'32098867 hectáreas de superficie agrícola en cultivos transitorios, cultivos permanentes y flores. Lo que representa el 47% de algún tipo de plaguicida químico con respecto a los tipos de cultivos (INEC, 2013).

El porcentaje de personas que manipulan los plaguicidas, no saben la toxicidad que representa. Según el INEC (2013) los porcentajes son: el 12% en hectáreas de cultivos permanentes (caña, palma, banana, cacao) y 10% en cultivos transitorios (arroz, maíz duro seco, maíz suave choclo, papa). Sobre todo lo aplican para tratar de proteger o combatir; sin saber que los protagonistas no solo son los compuestos químicos, sino que interviene el agricultor, cultivo y la incidencia en el ambiente.

Por ende, a elevadas aplicaciones puede darse la bioacumulación en las partículas de los diferentes recursos (aire, agua, suelo) dado que la recalcitrancia y suspensión que presentan las moléculas tóxicas varían por afinidad de sus propiedades (Betancur, 2013, pág. 17). Además Santana (2013) en su estudio menciona el reporte de CIATOX y resalta la incidencia de intoxicación de agricultores por insecticidas inhibidores de la colinesterasa como carbamatos.

La papa es uno de los productos más consumidos en los países andinos; como lo indica INEC (2014), en Ecuador representa 34014 hectáreas de superficie sembrada tomando

en cuenta la producción en las provincias Carchi, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo y Cotopaxi.

Al igual que otros cultivos presenta plagas y enfermedades como por ejemplo: trips, gusano blanco, pulguilla de la papa, mosca, áfidos, polilla de la papa o minadores de la hoja que se pueden controlar con insecticidas cuya toxicidad es moderadamente peligrosa (Aldás, 2012).

Según INEC (2014) se consume aún el 22.89% de estos insumos agrícolas tal como, insecticidas carbamatos o inhibidores de la colinesterasa debido a que los costos son económicos. Los insecticidas con nombres comerciales más aplicados son: Metomilaq 900, KUIK 900, Starcarb, Mancozeb, Furadan, Curater, Baygón, Lannate que se aplican en todo el ciclo de cultivo de la papa, ejerciendo acción en el foso-sináptico de las plagas (PLAGSALUD, 2005).

Los efectos de carbamatos en papa han tenido una significativa importancia en cuanto a la reducción y debilitamiento en la planta - tubérculo, tamaño de la planta, tamaño del tubérculo, color y maduración de la cáscara de la papa, además si son aplicados en el suelo causan efectos tóxicos y perjudiciales como la eutrofización, infertilidad, muerte de microorganismos benéficos, erosión, desertificación, contaminación, compactación adsorción sobre la materia orgánica, volatilidad y resistencia química (Sánchez & Sánchez Camazano, 1984).

Uno de los estudios de insecticidas en papa desarrollado por Gafar, Dagash, Elhag & Hassan (2011) exponen que incluso a cantidades recomendables se da un cambio en la producción, tal vez no en la primera cosecha pero si en las próximas.

Debido a las consecuencias manifestadas se ha tomado acciones en cuanto a las restricciones de dosis, usos y sugerencias en cuanto a insecticidas, basadas en normativas y reglamentos:

Decisión 436: Norma Andina para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola (FAO, 1998).

Decisión 684: Texto Unificado de Legislación Secundaria (AGROCALIDAD, 2008).
Reglamento de plaguicidas y productos afines de uso agrícola (AGROCALIDAD, 2003).

Mientras que en base al Plan del buen vivir (2013) en la sección 7.4 literal (e) incentiva a:

“Investigar los usos potenciales de la biodiversidad para la generación y aplicación de nuevas tecnologías que apoyen los procesos de transformación de la matriz productiva y energética del país, así como para la remediación y restauración ecológica”.

Complementando a esto la Constitución Política de la República del Ecuador (2008) en el Art.-1, menciona que “El estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto”.

El interés de plantear la investigación es aplicar y demostrar la eficiencia de técnicas de biorremediación utilizando micoremediación, debido a que los hongos no son tan exigentes en su crecimiento y que pueden tomar las moléculas químicas como una fuente de carbono y otros nutrientes. Suplantando a otras formas de degradación como volatilización, filtración, degradación química y la absorción por los cultivos (Quintero, 2011).

La aplicación de microorganismos debe ser inofensiva y sin variación en el ambiente. Por eso Schuster & Schmoll (2010) en su estudio enfatiza la aplicación de

microorganismos autóctonos ya que para procesos de degradación son más adaptables. Igualmente González (2009) en su libro “Biorremediación y tratamiento de efluentes” pronuncia que a estados de adaptación o estrés la activación de las diversas vías metabólicas a aplicarse por los hongos son: fermentaciones, respiraciones anaeróbicas, acción de enzimas y procesos quimiolitótrofos.

Aparte se pueden aplicar hongos ligninolíticos y no ligninolíticos y ser más eficientes que las bacterias en cuanto a la adaptación en hábitat terrestres, prolongación de sus hifas y producción de enzimas extracelulares como solución para biorremediar compuestos xenobióticos (Stamatiu, 2013).

Trichoderma harzianum es un deuteromicete, celulolítico y microorganismo autóctono de la rizósfera, que se desarrolla sin problema en suelos agrícolas con presencia de celulosa, cuyas esporas (conidios) poseen enzimas transformadoras, que al entrar en contacto con las partículas del suelo aumenta la resistencia a la erosión, transforma la materia orgánica, aumenta la porosidad, aireación y permeabilidad del suelo (España, 2015).

Pleurotus ostreatus es un basidiomiceto, ligninolítico que permite la descontaminación de compuestos persistentes gracias a las enzimas: lacasa y manganeso peroxidasa. La degradación se puede llevar a cabo en áreas demasiado profundas acuáticas o terrestres debido a la extensión de sus hifas y liberación de basidiosporas como mecanismo de acción efectivo para la formación de moléculas simples (Coello , 2011).

Por lo tanto se pretende evaluar la biodegradación de un insecticida carbamato en muestras de suelo de cultivo de papa mediante la aplicación de *T.harzianum* y *P. ostreatus*. Los objetivos específicos son: Diagnosticar las condiciones agroclimáticas

de la zona del cultivo de papa para el aislamiento de *T. harzianum*. Aislar esporas de *T. harzianum* y *P. ostreatus*; Determinar la concentración de plaguicidas carbamatos en muestras de suelo de cultivo de papa por técnicas analíticas; Evaluar la capacidad biotransformadora de *T. harzianum* y *P.ostreatus* sobre el suelo con carbamatos.

Las hipótesis planteadas en la investigación son:

Hipótesis alternativa: Los hongos en estudio biodegradan insecticidas carbamatos

Hipótesis nula: Los hongos en estudio no biodegradan insecticidas carbamatos.

La metodología se llevó a cabo en dos fases, de campo y laboratorio. La fase de campo consistió en la georreferenciación, muestreo de suelo del cultivo de papa y *P.ostreatus*, elaboración del terrario aclimatizado e inoculación de micelios con concentraciones de 38.3×10^6 conidias/mL y 33.6×10^6 basidiosporas/mL respectivamente en suelos contaminados cada tres días. La fase de laboratorio consistió en el análisis al inicio y final del proyecto de los parámetros fisicoquímicos de suelo en los laboratorios de Suelos de Cayambe de la Universidad Politécnica Salesiana; análisis de plaguicidas en suelos por HPLC en los laboratorios de Comisión de Energía Atómica; el aislamiento de *T. harzianum* se realizó a partir del suelo del cultivo de papa y el aislamiento de *P.ostreatus* en base al cuerpo fructífero (sombbrero) mediante técnicas microbiológicas en los Laboratorios de Ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

Se utilizó un diseño completo al azar (DCA), con 4 tratamientos, 4 repeticiones para cada tratamiento y 16 unidades experimentales. En la parte estadística se aplicó a todas las variables (temperatura, humedad y pH) un análisis de varianza (ADEVA) y la prueba de Tuckey al 5 %.

Capítulo 1: Marco conceptual

Este capítulo comprende la recopilación de información importante para el desarrollo del tema. Los plaguicidas han aportado una mejora significativa en la producción agrícola pero han ejercido un efecto adverso en el ambiente debido a su toxicidad, bioacumulación y persistencia en suelo, aire y agua (Valderrama, Baena , & Pérez, 2012).

1.1 Plaguicidas o pesticidas

Según el Libro VI: Anexo1: Norma de calidad y descarga de efluentes: recurso agua.

“Los pesticidas son sustancias usadas para evitar, destruir, repeler o ejercer cualquier otro tipo de control de insectos, roedores, plantas, malezas conocidas como plagas indeseables u otras formas de vida inconvenientes.” (MAE, 2015).

Estos productos formulados con ingredientes activos se clasifican desde varios puntos de vista: uso, composición química y acción tóxica (Tabla 1), también se clasifican de acuerdo a la toxicidad (Tabla 2).

Tabla 1

Clasificación de plaguicidas

| Por su uso | Composición química | | Acción tóxica |
|---------------|------------------------|-------------------|------------------|
| | Inorgánicos | Orgánicos | |
| Acaricidas | Derivados del Cobre | Organoclorados | De contacto |
| Fungicidas | Azufre | Organobromados | Sistémicos |
| Bactericidas | Derivados del Mercurio | Organofluorados | Digestivos |
| Insecticidas | Sales de Zinc | Organofosforados | Fumigantes |
| Nematicidas | Sales de Manganeseo | Carbamatos | Repelentes |
| Herbicidas | Sales de Arsénico | Piretroides | Acción Biológica |
| Rodenticidas | Cianuros | Piretrinas | |
| Molusquicidas | Cloratos, boratos | Dinifenoles | |
| | | Fenólicos | |
| | | Misceláneos | |
| | | Aceites minerales | |

Fuente: Soissa, Maige, Molinos & Aguayo (2005).
Elaborado por La autora, 2016.

Tabla 2

Toxicidad de plaguicidas en función de DL50.

| Clasificación | | | DL50 AGUDA (ratas) mg/kg peso corporal | | | |
|---------------|--------------------------------|----------|--|-------------|-------------|---------|
| Clase | Peligro | Color | Vía Oral | | Vía cutánea | |
| | | | SÓLIDO | LÍQUIDO | SÓLIDO | LÍQUIDO |
| I a | Sumamente peligroso | Rojo | ≤ 5 | ≤20 | ≤10 | ≤40 |
| I b | Altamente peligroso | Rojo | 5>50 | 20>200 | 10>100 | 40>400 |
| II | Moderadamente peligroso | Amarillo | 50>500 | 200>2000 | 100>1.000 | 400>400 |
| III | Ligeramente peligroso | Azul | 500>2.000 | 2.000>3.000 | >1.000 | >4.000 |
| IV | Normalmente no ofrecen peligro | Verde | >2.000 | >3.000 | | |

Fuente: Camargo (2016).

Elaborado por La autora, 2016.

1.1.1 Carbamatos

A partir de su introducción en 1950 se consideraron como insecticidas de segunda generación y como reemplazo de los organoclorados. Son un grupo principal de plaguicidas orgánicos sintéticos y a la vez siendo más consumidos a gran escala en todo el mundo (Rendón, 2013).

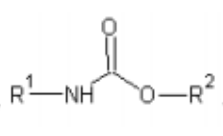
Químicamente son ésteres del ácido carbámico (HO- CO-NH₂) con sustitución tanto en el grupo amino como carboxilato. Los plaguicidas carbámicos poseen esta estructura (R¹- NH₂-CO-OR²) donde, R¹ y R² son grupos alquilo o arilo (Tabla 3) (Rendón, 2013).

La mayoría de insecticidas carbámicos son N-alquil carbamatos, con la fórmula (Alq-NH-CO-OAr), también hay los fenil ésteres del ácido carbámico (Teran, 1998).

El uso de plaguicidas en Ecuador superó los 28 millones de kilogramos, de los cuales el 97% correspondieron a insecticidas de categoría II moderadamente peligroso (organofosforados y carbamatos) (Villafuerte, 2011).

Tabla 3

Estructura química de Ácido Carbámico

| Estructura química | Extremos | Sustituyentes |
|---|------------------|-----------------------------|
|  | R1 - Amino | Metil |
| | | Dimetil |
| | R2 - Carboxilato | Aril |
| | | Alcohol alifático aromático |

Fuente: Rendón (2013).

Elaborado por La autora, 2016.

a) Propiedades y usos

Dependiendo del reemplazo de radicales, varían las propiedades químicas por lo que se aplicarían dependiendo de las plagas como:

Los insecticidas que contienen benceno, son estables con baja presión de vapor y solubilidad baja en agua; pueden ser colocados en la planta pero pueden alcanzar el suelo (IPCS , 1986).

Los fungicidas contienen un grupo bencimidazol y también pueden ser aplicados en la planta (IPCS , 1986).

Los nematicidas y herbicidas en su estructura el R1 y R2 son aromáticos o restos alifáticos, por lo que pueden ser aplicados directamente en el suelo (Rendón, 2013).

Otra de las propiedades, es que se consideran poco persistentes y podrían permanecer en el ambiente entre 29 y 120 días, mientras que en el humano se podrían excretar en la orina (Bouaid, 2008).

b) Modo de acción

Similares a los insecticidas organoclorados, pero las características farmacocinéticas los diferencian:

- No sufren proceso de envejecimiento, la unión entre el tóxico y la colinesterasa es reversible.

- Estos compuestos no cruzan de forma fácil la barrera hematoencefálica por lo que los síntomas en el sistema nervioso central son limitados (Auquilla, 2015).

Arriaza (2005) menciona que se absorben por todas las vías cutánea, respiratoria, digestiva y no se acumulan en el organismo. Requena (2009) actúan inhibiendo de forma transitoria la acetilcolinesterasa no manifestando efectos sobre el sistema nervioso central.

Su mecanismo de acción es como sustancias anticolinesterásicas (permitiendo que la acetilcolina ejecute su actividad) y reaccionan con la enzima de manera similar a la acetilcolina: La acetilcolinesterasa produce la inactivación del neurotransmisor acetilcolina (AC) disminuyendo la transmisión del impulso nervioso. Las reacciones químicas son:

Paso 1: $AB + \text{enzima (acetilcolinesterasa)} \rightarrow B + \text{acetilcolinesterasa modificada (A)}$.

Paso 2: $\text{Acetilcolinesterasa modificada (A)} + H_2O \rightarrow A + \text{Acetilcolinesterasa}$.

Dónde:

AB representa la molécula del carbamato; en el primer paso, la parte ácida (A) del plaguicida se incorpora covalentemente en el sitio activo de la enzima, mientras que se libera su fracción alcohólica (B) (Arriaza, 2005).

c) Transformación metabólica

A través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación. La eliminación se hace principalmente por vía urinaria en aproximadamente 3 días (Auquilla, 2015).

- **Hidrólisis:** Es catalizada por enzimas como esterases o arylesterasas (EC 3.1.1.2), resultando como productos finales una amina, dióxido de carbono y un alcohol o fenol. Esta reacción es más rápida en mamíferos que en plantas e insectos.
- **Oxidación:** Asociado con la mezcla de función oxidasas (MFO) enzimas que están presentes en diversos tejidos.
- **Conjugación:** Reacción que conduce a la formación de compuestos solubles en agua tales como O y N glucurónidos, sulfatos y ácido mercaptúrico que pueden ser eliminados a través de orina o heces (IPCS , 1986).

d) Transporte en el ambiente

De forma general, la presión del vapor de estos insecticidas es baja por lo que pueden sublimarse lentamente a temperatura ambiente. Puede entrar en aguas superficiales y la contaminación a largo plazo puede causar efectos adversos en animales acuáticos. Mientras que en el suelo puede ser por la lixiviación, humedad del suelo, absorción, pH, temperatura que mantengan al químico (Gray, 1971).

e) Efectos

- **Hombre:** el exceso de trabajo puede resultar con el envenenamiento caracterizado por síntomas colinérgicos por la inhibición de la AChE; otros síntomas indicativos tales como irritación cutánea y ocular, hiperpigmentación y la influencia en la función de los testículos (anormalidades en espermatozoides), estos síntomas pueden durar pocas horas y desaparecer porque pueden ser rápidamente metabolizados y excretados (Aldás, 2012).
- **Ambiente:** Los carbamatos y sus metabolitos a dosis altas afectan a la microflora sobre todo a gusanos y lombrices además erosionan y bajan la productividad del suelo, volviéndolo infértil. En el agua algunos carbamatos no son muy estables y

la persistencia es baja por lo que se metabolizan rápidamente, otros pueden acumularse y reducir la población acuática; en el aire pueden quedar metabolitos suspendidos (IPCS , 1986).

- **Suelo:** la mayoría sufre degradación microbiana, pero dependiendo del suelo en el que se aplica puede acumularse y generar persistencia entre 2 a 3 meses; en los arcillosos y orgánicos retienen más residuos que en los arenosos (Del Puerto Rodríguez, Suárez, & Palacio, 2014).
- **Vegetación:** Se da una adsorción y translocación de carbamatos, mediante las raíces son fácilmente absorbidos y movilizados a diferentes partes de la planta, es decir que se distribuyen por sistema apoplásico (Gafar, Dagash, Elhag, & Hassan, 2011).
- **Papa:** Los efectos positivos se pueden ver en la primera siembra y cosecha, pero a partir de la segunda siembra pueden tener efectos residuales prolongados y perjudicar al crecimiento vegetativo, rendimiento del tubérculo y raíz mientras que la altura se mantiene (Gafar, Dagash, Elhag, & Hassan, 2011).

1.2 Biorremediación

Es el empleo de organismos (microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos, y procesos) con el fin de retomar un medio alterado por contaminantes y disminuir o regresar a su estado natural (Parraguez, 2013). La biorremediación funciona a nivel sub-celular, unicelular o multicelular, entre la clasificación que se pueda dar es por degradación enzimática; remediación microbiana (micoremediación) y fitorremediación (Alegria, 2013).

Los procesos vinculados con microorganismos de Biorremediación, según PQBio (2015) pueden ser:

- Degradación enzimática

Consiste en el empleo de enzimas en el sitio de contaminación, las enzimas se obtienen en cantidades industriales por bacterias que se producen naturalmente o bacterias modificadas.

- Remediación microbiana o Microremediación

Utiliza microorganismos directamente en el foco de la contaminación, pueden ser autóctonos o pueden provenir de otro ecosistema.

1.2.1 Microremediación

La biodegradación por hongos independientes es la degradación en simbiosis micorrízica y degradación por cometabolismo. Cualquiera de las dos técnicas, es más económica tanto en términos de costo, de instalación como de operación y mantenimiento (Argumedo, Alarcón, Ferreta-Cerrato, & Peña-Cabriales, 2009) y (Cañizares-Villanueva, 2000).

Además son fácilmente cultivables y manipulables puesto que profundizan sus estructuras miceliarias en capas de sustratos muy profundas y son capaces de usar los plaguicidas como fuente de nutrientes, aunque requieren de una previa adaptación al medio y a los contaminantes que van a degradar (Coello, 2011).

Entre los hongos lignolíticos y no lignolíticos que se aplican para degradar plaguicidas son: *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida*, *Cyathus bulleri*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium* sp, *Mucor circinelloides*, *Penicillium janthinellum*, *Aspergillus* (Stamatiu, 2013).

La principal idea de utilizar microorganismos es para degradar moléculas orgánicas y que formen parte de obtención de energía o fuente de carbono (PQBio, 2015). Existen dos formas de como los hongos pueden degradar el plaguicida.

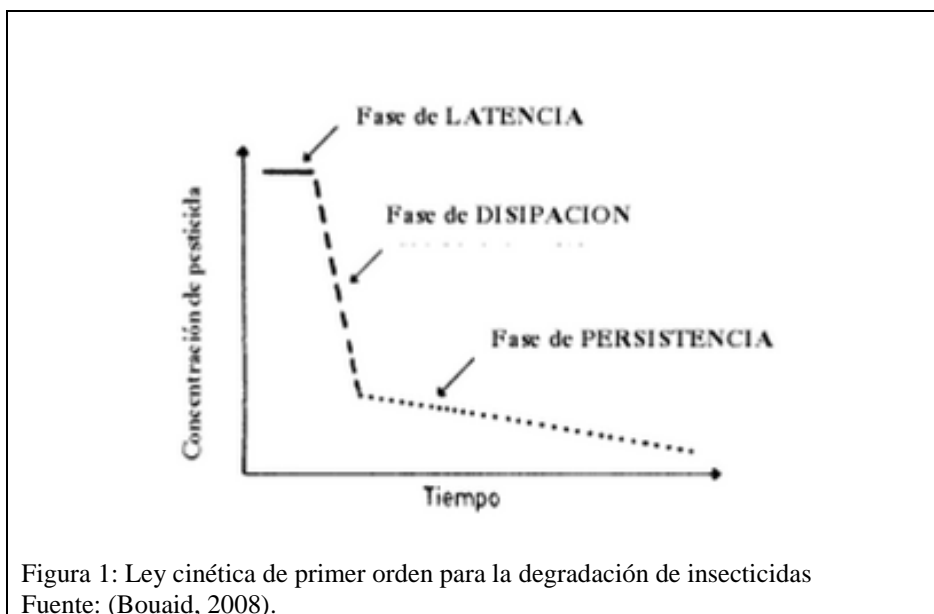
- Las moléculas de la sustancia pueden proveer y favorecer el crecimiento microbiano siendo empleada como fuente de carbono, energía y raras veces como fuente de nitrógeno, azufre; por lo que tiende a aumentar su propagación.
- La molécula del insecticida no es la fuente de nutrientes sino que por cometabolismo; al momento de reducir sustratos necesarios (glucosa) induce a la activación de enzimas necesarias para la degradación del plaguicida. Las reacciones catabólicas ocurren cuando la dosis de los agroquímicos es demasiado alta y la estructura química permite su degradación. Las reacciones que se pueden llevar a cabo son:

Detoxificación: Conversión de una molécula tóxica en otra menos tóxica.

Degradación: Transformación de una sustancia compleja en productos más simples, ejemplo la mineralización que da como resultado la aparición de CO_2 , H_2O , NH_3 .

Conjugación: Formación de compuesto por reacciones de adición, en el que el microorganismo cambia el plaguicida con metabolitos celulares como: adición de aminoácidos, ácidos orgánicos, etc (González, 2009).

La desaparición del insecticida en el suelo transcurre de acuerdo a la cinética de primer orden (Figura1).



Las condiciones favorables para que los microorganismos reaccionen e inicien su metabolismo y mecanismos de acción son: Humedad 40-85 % de la capacidad de campo, pHs entre 6 – 8, temperaturas entre 25°C y contaminante <50000ppm y número de microorganismos > 1000 UFC/g 35 °C suelo (Velasco & Sepúlveda, 2009).

1.2.1.1 *Trichoderma harzianum*

Corresponde a la subdivisión Deuteromycetes, orden Hyphales, familia *Monilaceae* y género *Trichoderma*. Es un hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo, aerobio que se encuentra de manera natural en suelos agrícolas y otros tipos de medios; existen más de 30 especies la mayoría con ventajas en la agricultura y otras ramas (Vallejo, 2014).

Además se presenta en diferentes zonas y hábitats primordialmente en sitios con abundante materia orgánica, debido a su pared celular compuesta por quitina, de crecimiento rápido que utiliza sustratos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Crecen en un amplio rango de temperaturas, toleran humedades bajas y suelos ácidos. Contienen una variedad de enzimas polisacáridas, proteasas, lipasas, quitinólíticas, quitinasas (Cholango, 2009).

a) Características macroscópicas del micelio

Posee un micelio aéreo flucoso, blanco o ligeramente gris, conidiación que cubre con frecuencia la superficie de la placa, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril que produce pústulas aplanadas hasta 8mm de diámetro, concéntricas o cerca de márgenes de la placa; exudados incoloros a ámbar o amarillo verdoso (Cholango, 2009). La colonización (fialosporas) que otorgan el verde oscuro opaco se presenta de forma plana lisa o abultada formando pústulas compactas (Noboa & Quelal, 2015, pág. 22).

b) Características microscópicas del micelio

El micelio está compuesto por hifas hialinas, septadas y ramificadas (anchas y rectas o relativamente angostas y flexibles) (Noboa & Quelal, 2015, pág. 24); y tres partes fundamentales: a) conidióforos que son hialinos, altamente ramificados y pueden mostrar una disposición en forma piramidal o cónica dando origen a esterigmas con extremos ahusado; b) fiálides, son hialinas en forma de frasco y se inflan en la base y están asociadas a los conidióforos en ángulo recto, pueden ser verticales en parejas o solitarias alternadas en disposiciones irregulares en racimos; y c) conidios, son unicelulares redondos o elipsoidales y de pequeños cilindros, de tamaño de 2 a 3 μm de diámetro promedio la parte final en forma estrecha basal y truncada (Cholango, 2009) y (Barnett & Hunter, 1982).

c) Requisitos para crecimiento

En periodos de luz, oscuridad y rango de pH de neutro a ácido de preferencia 5.5 favorece la esporulación rápidamente, utiliza amplio espectro de fuentes de CO₂ y N (Tabla 4) (Cholango, 2009). Las necesidades nutricionales que necesita son fuentes de carbono (almidón, pectina, etc), nitrógeno (urea, sulfato de amonio), elementos traza como minerales (Fe, Zn, Cu, etc) (Noboa & Quelal, 2015).

Tabla 4

Etapas y parámetros de crecimiento para *T. harzianum*

| Morfología | Día | Temperatura (°C) | Humedad (%) | Aireación | Luz relativa (lux) |
|---|---------|------------------|-------------|-----------|--------------------|
| Esporulación y Colonización de superficie | 5 -8 | 20-25 | 70 | 24h | 0 |
| Invasión | 9 – 15 | 25-28 | 70 | 24h | 0 |
| Exhudados | 16 – 25 | 25-28 | 80 | 24h | 10 |

Fuente: Cholango (2009).

Elaborado por La autora, 2016.

d) Mecanismos de acción

Los distintos mecanismos de acción directa o indirecta son: antibiosis, micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, promoción del crecimiento de las plantas, degradación de agroquímicos e inducción de resistencia (Serpa, 2015).

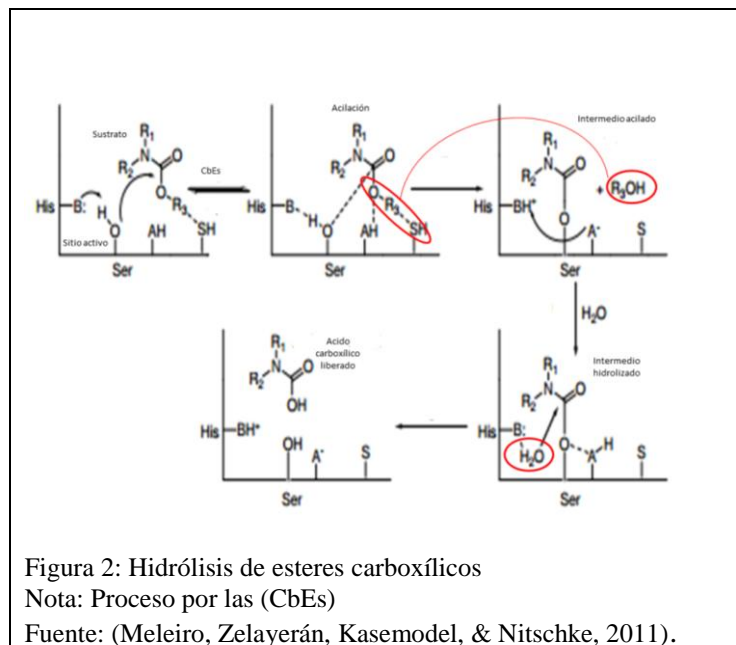
Martínez, Infante & Reyes (2013) y Flores (2015) destacan la ventaja de degradar agrotóxicos es mediante metabolitos secundarios (enzimas líticas extracelulares): glucanasas, proteasas, celulosas, hemicelulosas, y xylanases que contribuyen a la ruptura de moléculas complejas. También producen polisacaridasas, lipasas, esterases, quitinolíticas que pueden ser usados en la degradación de paredes celulares (Briceño, Encinas, Mohali, Mora , & Molina, 2008).

El desempeño de estas enzimas se da por la penetración de la hifa en el sustrato y en los diferentes niveles de crecimiento, en el juvenil tiene mayor relación con la molécula del agroquímico que cuando este madura (Martínez, Infante, & Reyes, 2013).

e) Rutas metabólicas para carbofurán

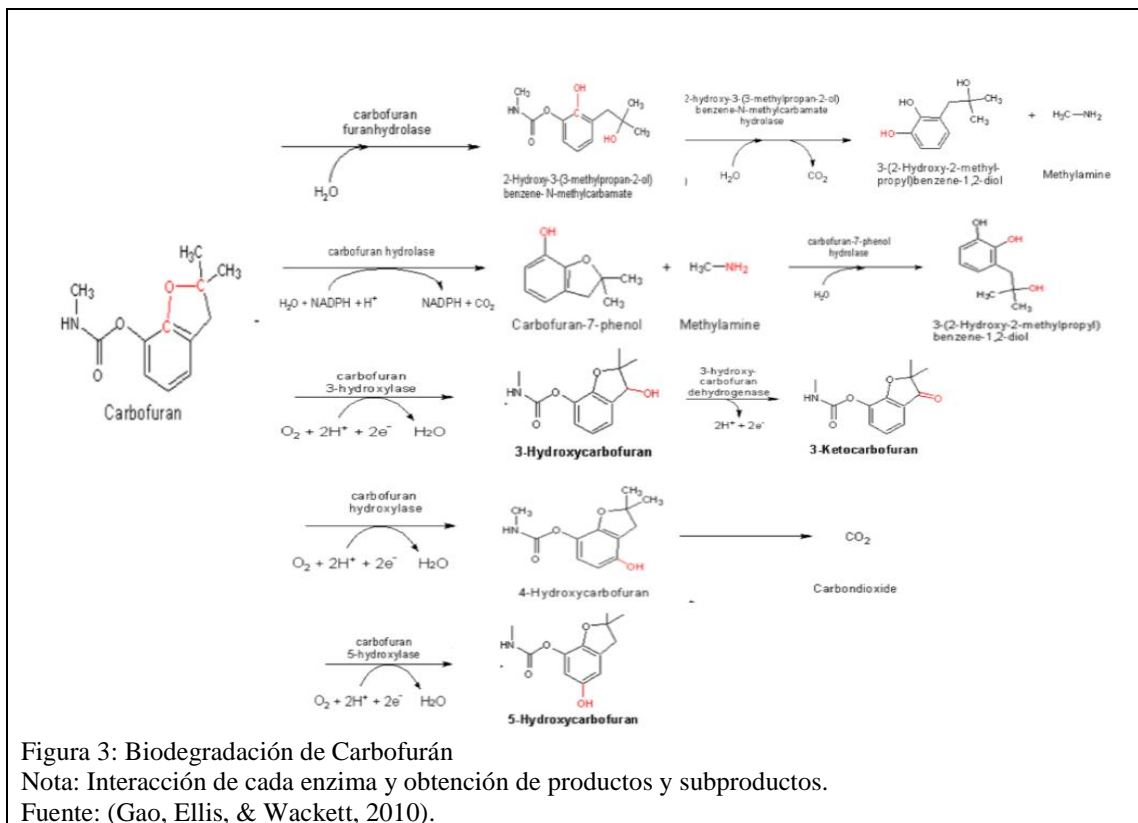
- La posible reacción que se llevaría a cabo es hidrólisis enzimática, como mecanismo primario de inactivación, se podría dar por dos vías: ruptura del enlace

éster o ruptura del enlace amida por cualquier caso interaccionan las enzimas hidrolasas; produciendo finalmente carbofurán 7 fenol (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol). La hidrólisis de ésteres carboxílicos por carboxil esterasas (CbEs) (Figura 2) se basa en la acilación reversible de un residuo de serina dentro del centro activo de la proteína; en primer lugar el sustrato debe tener acceso al sitio activo y la acilación provoca la liberación de la molécula y de la enzima covalente acilada. El intermedio acilado es hidrolizado por ataque nucleofílico que libera la fracción del ácido carboxílico conjuntamente las enzimas activas pueden seguir en ciclos catalíticos (Meleiro, Zelayarán, Kasemodel, & Nitschke, 2011).



- En el caso del insecticida en estudio, Según Singh & Dwivedi (2005) explica que además de la hidrólisis del éster de carbamato en el fenol, se puede dar la oxidación del metilo del anillo de furanilo en alcohol y cetona.

A continuación, se describen las rutas y enzimas exclusivas para la potencial degradación (Figura 3):



1.2.1.2 *Pleurotus ostreatus*

Hongo de pudrición blanca, cosmopolita, saprofito, semi anaerobio que soporta 32 % de CO₂ y fija nitrógeno atmosférico; se encuentra en ambientes naturales sobre troncos y plantas leñosas en descomposición. Pertenece a la clase Basidiomycetes, orden Poriales, familia *Lentinaceae* y género *Pleurotus*, la principal característica es su carne compactada en el sombrero, fibrosa y blanca en el pie con sabor, olor agradable y su variedad de colores (blanco, castaño, azulada y rosada).

La facilidad de técnicas simples, baratas, adaptación a los ambientes de cultivos y capacidad por degradar materiales lignocelulósico (aserrín, madera, etc) favorece con el cultivo y el desarrollo de proteínas de alta calidad biológica, vitaminas, fibras, minerales y enzimas con altos beneficios (Aguilar, 2012).

Una de las enzimas, llamada lacasa (p-difenol:dioxígeno:óxido-reductasa, EC 1.10.3.2), cataliza una reacción que degrada la lignina mediante peróxido de hidrógeno procesado por el mismo hongo; también catalizan la oxidación, polimerización, depolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (lignina y taninos). Se considera importante en su aplicación como biorremediador de suelos contaminados debido a la capacidad de romper una gran cantidad de enlaces diferentes y por lo tanto de degradar una gran variedad de compuestos orgánicos (Coello , 2011). Además, por la extensión de sus hifas, puede alcanzar contaminantes, que nos son biodisponibles ni biodegradables para otros organismos (Barr & Aust, 1994).

a) Características macroscópicas del micelio

El micelio *in vitro* es aéreo, blanco con tonos amarillentos y algodonoso crece hasta 9cm de diámetro invadiendo todo la caja petri después de ocho días, pasado este tiempo tiende a producir sustancias amarillentas encima de la parte algodonosa (Arango, 2010).

b) Características microscópicas del micelio

El micelio presenta hifas de paredes delgadas con fíbulas (condición dicariótica del micelio), en las puntas están basidiosporas de color café grisáceo (Perez, 2006). Las esporas son cilíndricas de 7.5 - 11 μm x 3 - 4 μm (Aguilar, 2012).

c) Requisitos para crecimiento

Tabla 5

Parámetros de etapas de crecimiento para *P. ostreatus*.

| Morfología | Día | Temperatura (°C) | Humedad (%) | Aireación | Luz relativa (lux) |
|-----------------------------------|---------|------------------|-------------|-----------|--------------------|
| Germinación | 1 – 4 | 22-24 | 65 | - | 0 |
| Colonización de superficie | 4 -15 | 22-24 | 65 | 10min/12h | 0 |
| Invasión | 16 – 35 | 22-24 | 65 | 1h/8 | 0 |

| | | | | | |
|-------------------------------|----------------|-------|----|-----|----|
| Formación de primordio | 35 – 45 | 17-19 | 70 | 24h | 10 |
| Fructificación | más de 45 - 54 | 18-21 | 90 | 24h | 10 |

Fuente: Suáres (2010).

En cuanto al crecimiento *in vitro* se demora 8 días a una temperatura de 25°C, con una humedad del 65% sin aireación y sin luz relativa con pHs recomendados entre 5 - 7 (Suáres, 2010).

d) Mecanismos de acción

Presenta mecanismos en base a catálisis enzimática y degradación empleando un sistema enzimático extracelular definido por tres enzimas: Lignino peroxidasa (LiP), Manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa, actúa con mecanismos de degradación y mineralización de materiales lignocelulósicos:

- Degrada lignina, celulosa y hemicelulosa
- Degrada lignina y hemicelulosa en la etapa de crecimiento del hongo para facilitar la accesibilidad enzimática (Proaño, 2011).

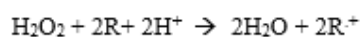
El metabolismo ligninolítico o sistema de degradación de lignina (SDL) extracelular induce por la deficiencia de nutrientes principalmente de nitrógeno y carbono. Se conoce como el sistema catabólico más importante para la degradación de xenobióticos en el cual se interponen enzimas peroxidadas como lacasas que son oxidasas capaces de despolimerizar lignina y sus derivados para llevar a cabo el ciclo catalítico; las MnP (manganeso peroxidadas), son hemo proteínas que catalizan la oxidación Mn^{+2} a Mn^{+3} , presenta el potencial de oxidación suficiente solamente para absorber electrones de estructuras fenólicas; y las LiP (lignino peroxidadas) ejecutan la acción oxidativa, es decir formar radicales libres a partir de compuestos orgánicos como alcohol veratrílico (AV) o dimetoxibenceno (DMB). Las dos últimas enzimas son dependientes de peróxido de hidrógeno (Quintero, 2011).

Otros mecanismos enzimáticos son de tipo oxidativo y uno reductivo como se observa en la Figura 4:

- Degradación de lignina por enzimas ligninolíticas peroxidadas ejerciendo ataques oxidativos a moléculas orgánicas por medio de radicales libres.
- Fase I: Metabolismo, mecanismo oxidativo por enzimas citocromo P-450 monooxigenasas.
- Fase II: Cataliza reacciones de conjugación mediante un conjunto de enzimas (Quintero, 2011).

Es decir que este género de hongos aplica sistema enzimático lignolítico, pero aun así degradan en condiciones no lignolíticas por reacciones de oxidación, hidroxilación y reducción. Consecuentemente la degradación o modificación de contaminantes se podría dar por cometabolismo, en otras palabras las moléculas no son empleados como sustratos para su crecimiento.

Peroxidasas



Citocromo P-450 monooxigenasas

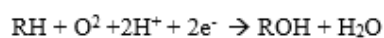
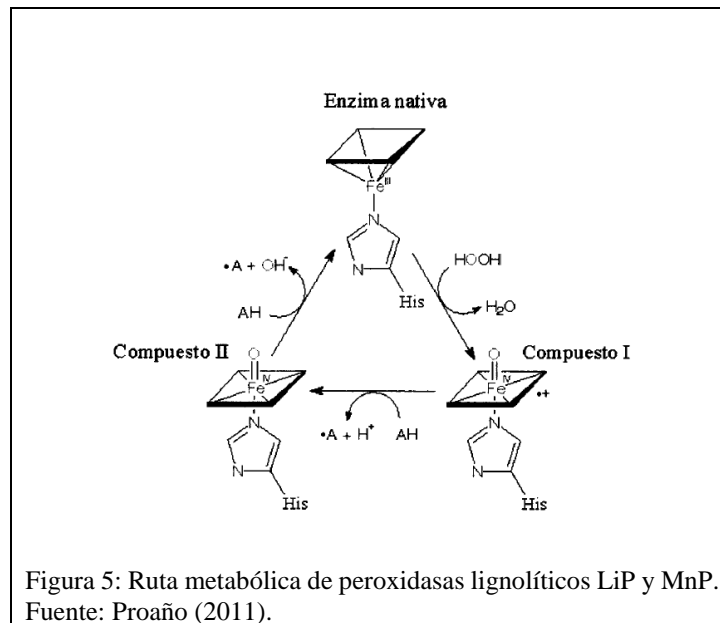


Figura 4: Mecanismos enzimáticos de *P. ostreatus*.
Fuente: Quintero (2011).

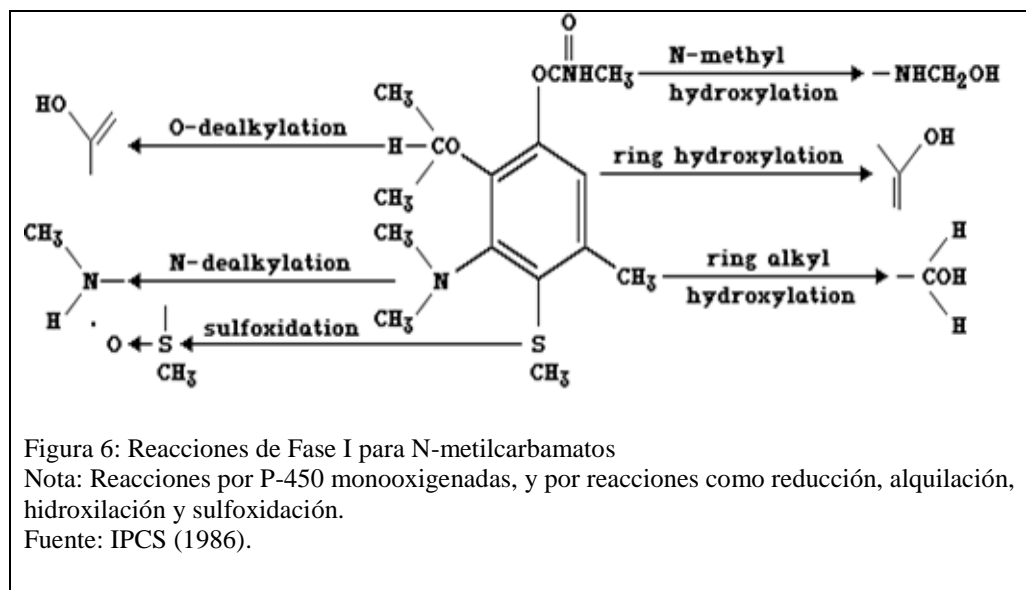
La catálisis enzimática es producida en la maduración del micelio alrededor de los 15 días con esporas en estado juvenil, asimismo comienza a producir metabolitos secundarios al evadir que otros microorganismos lo parasiten, y sobrevivan en su ambiente (Suárez, 2010).

e) Rutas metabólicas para carbofurán



- De acuerdo a la Figura 5, el sistema ligninolítico degrada en base a las enzimas peroxidasas; mediante las LiP y MnP ocurre el anclaje del sitio activo de la enzima con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que provoca la reducción a H_2O y la oxidación por dos electrones de la proteína férrica a un intermediario (Compuesto I). El Compuesto I posee dos equivalentes reductores y un centro oxiferril ($Fe^{4+}=O$) y un radical pi-catiónico; este radical puede estar ubicado en el grupo hemo, como en algún residuo de la proteína, dependiente de la isoenzima. El Intermediario se reduce, un electrón de una molécula del sustrato reductor (AH) que da lugar a un radical del sustrato (A^+) y al compuesto II, en el cual el radical catiónico se reduce al estado nativo. El compuesto II se reduce con un electrón de una segunda molécula de sustrato reductor, hasta el estado nativo de la enzima que contiene el Fe^{+3} (Proaño, 2011).

- Como se mencionó anteriormente, en base a las condiciones no ligninolíticas de los sustratos a biodegradar se obtiene posibles productos por la bioconversión fúngica que incluye fenoles, epóxidos, dihidrodioles y quinonas son llevadas a cabo por enzimas citocromo P-450 monooxigenasa y epóxido hidrolasa. Las reacciones de las fases I y II conocidos como procesos bioquímicos necesarios para eliminarlos.



De acuerdo a la Figura 6, los carbamatos podrían ser asimilados en la Fase I, P-450 monooxigenadas, introduciendo átomos de oxígeno en un amplio rango de radicales para mayor polaridad e hidrosolubilidad; estos pueden ser inestables o se puede dar un reordenamiento a fenoles o hidratación enzimática por otra enzima, la epóxido hidrolasa produciendo trans- dihidrodioles.

La fase II, se llevaría a cabo por reacciones de carácter reductivo, conocidas como vías de conjugación guiadas por glutatióntransferasa, sulfotransferasa y glucosyltransferasa; son aquellas que agregan glutatión, sulfato o residuos de azúcar, facilitando la solubilidad en agua y eliminación (Quintero, 2011).

1.3 Pesticide Impact Rating Index (PIRI) software – CSIRO

La Valoración del índice de impacto de plaguicidas (PIRI), permite evaluar los riesgos en el medio ambiente, especialmente cuando se trata de física, química y las interacciones biológicas de los plaguicidas a escala de cuenca hidrográfica. Sin embargo, los indicadores de riesgo pueden desempeñar un papel importante en la identificación de los plaguicidas, así como escenarios asociados con su uso que puedan presentar riesgo relativamente alto o más bajo (PIRI CSIRO, 2016).

Integra diversos factores que determinan el impacto de los plaguicidas en el medio ambiente, como son: valor del activo (por ejemplo, un recurso agua adyacentes que pueden ser amenazada); fuentes de amenaza (por ejemplo una cierta carga de plaguicidas) a la de los activos y vías de transporte (por ejemplo, la deriva de pulverización) por el cual se libera la amenaza. Información sobre las propiedades de plaguicidas, el suelo y las condiciones ambientales y los factores específicos del sitio está integrado en el proceso.

PIRI combina información sobre las propiedades y la toxicidad de los plaguicidas para los organismos acuáticos, con información sobre su destino y comportamiento en el suelo elegido y las condiciones ambientales del medio ambiente, para predecir y reducir al mínimo el potencial de movimiento fuera de las instalaciones de los plaguicidas a los canales adyacentes (PIRI CSIRO, 2016).

Capítulo 2: Metodología

En este capítulo se describe el desarrollo experimental en dos etapas: fase de campo (georreferenciación, recolección de muestras, elaboración de terrario aclimatizado, inoculación del suelo, montaje del ensayo); fase de laboratorio (preparación de medios de cultivo, métodos de aislamiento de microorganismos) con el apoyo de los laboratorios de Calidad de Suelos de Cayambe, Comisión de Energía Atómica y Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

2.1 Localización

- Suelo del cultivo de papa

Ubicado en la provincia de Carchi, sector El Capulí (Figura 7) a 2957 m.s.n.m de altitud con temperaturas entre 4 °C y 22.9 °C y coordenadas UTM: 018N4141mE y 0063320mN.



- *P. ostreatus*

Ubicado en el sector de Calacalí (Figura 8) a 2831 m.s.n.m y temperaturas entre 8 °C y 19 °C con coordenadas UTM: 017M 776636mE y 0mN.



- Ensayo de biorremediación

El ensayo de biorremediación se realizó en un invernadero ubicado en Pichincha, Quito, parroquia La Magdalena (Figura 9) con coordenadas UTM: 017M 774455mE y 9972532mN a 2840 m.s.n.m. de altitud con temperaturas entre 10 °C y 19 °C.



2.2 Fase de Campo

2.2.1 Georreferenciación

Mediante un GPS, se procedió a verificar los satélites y ubicó la zona 17 correspondiente a Ecuador; se generó la ubicación exacta de los puntos de muestreo en el terreno del cultivo de papa en un mapa y en cada uno de ellos se tomó los datos de la altura y coordenadas UTM (Ver Anexo 1: A -B).

2.2.2 Muestreos, transporte y almacenamiento

a) Suelos de cultivo de papa

El método se llevó a cabo en forma de zigzag o también llamado tres bolillo; en cada punto de muestreo con un azadón, se fue cavando en forma de “V” hasta una profundidad de 20 cm. El suelo fue depositado en costales de yute para una mezcla homogénea. De los costales se tomó 3 muestras de 1 kg en fundas ziploc y etiquetó para los análisis físico químicos y químico analíticos El transporte se realizó mediante coolers con hielo seco hacia los laboratorios de Calidad de Suelos de Cayambe y Comisión de Energía Atómica (Ver Anexo 1 C - F).

b) Agua

Se tomó 1L en un recipiente de vidrio ámbar, aforándolo completamente y se tapó herméticamente y se transportó en coolers con hielo a los laboratorios de Comisión de Energía Atómica (Ver Anexo 1 G – H).

c) *P. ostreatus*

Se recolectó cuando el crecimiento del hongo estaba óptimo, mediante un movimiento de mano se giró el estipe (base del hongo) y con la otra mano se sostuvo el sustrato para evitar que rupturas del carpóforo (Ver Anexo 2 A).

2.2.3 Construcción de terrario aclimatizado

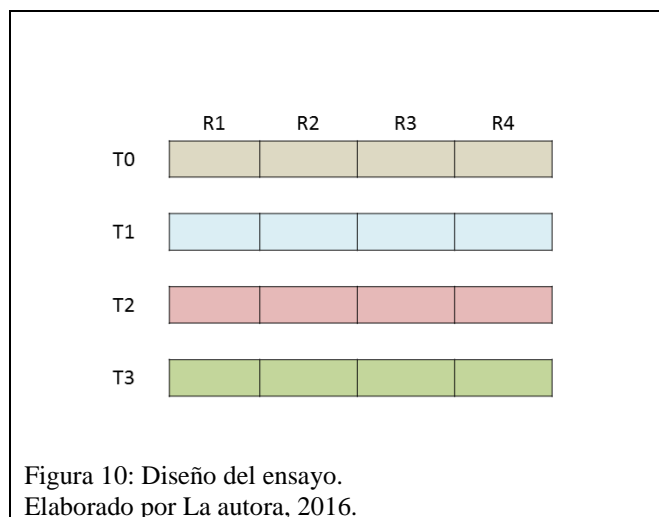
Se ´cortaron 4 vidrios de 4 mm de grosor: 2 vidrios de 60 x 100 cm y 2 vidrios de 100x100 cm, cada vidrio cortado se colocó en un vidrio base pegado con silicona resistente al agua y se dejó secar por 15 días. Luego se llenó el agua hasta 10 cm de altura y se sumergió el humidificador y colocó la red plástica que dio soporte a las fuentes. En la parte superior del terrario se instaló una lámpara de luz fluorescente y en el interior se colocaron los hongos en crecimiento (Ver Anexo 2 B - H).

2.2.4 Inoculación del insecticida

La inoculación del insecticida se realizó debido a que el muestreo del suelo se efectuó en la etapa de post cosecha del cultivo, por lo que para constatar la presencia y concentración del insecticida, se disolvió en 1 L de agua volúmenes de insecticida de 10 mL, 30 mL, 50 mL, 70 mL, 90 mL y 100 mL de forma progresiva en el transcurso de dos semanas; revolviendo y homogenizando el suelo en cada una de las inoculaciones.

2.2.5 Diseño experimental e implementación del ensayo

El diseño llevado a cabo fue DCA (Diseño completamente al azar) de 4 tratamientos, 4 repeticiones y 16 unidades experimentales. En condiciones ambientales de 19 °C, 79 % de humedad y 12 horas de lux y 12 horas de oscuridad. Cada unidad experimental representa una caja de 22 X 18 cm forrada de plástico negro y con 1 kg de suelo inoculado con insecticida, como se muestra en la Figura 10 (Ver Anexo 3 A-D).



2.2.6 Tratamientos

En las 4 repeticiones, se implementó los tratamientos en mención de la Tabla 6 respectivamente.

Tabla 6

Descripción de tratamientos.

| Tratamientos | Descripción |
|--------------|---|
| T0 | Suelo + insecticida |
| T1 | Suelo + insecticida + <i>T. harzianum</i> |
| T2 | Suelo + insecticida + <i>P. ostreatus</i> |
| T3 | Suelo + insecticida + <i>T. harzianum</i> + <i>P. ostreatus</i> |

Elaborado por La autora, 2016.

2.2.7 Aplicación del inóculo micelial

Se inoculó volúmenes de 250 mL de hongos en concentraciones de 38.3×10^6 conidias/mL de *T. harzianum* y 33.6×10^6 basidiosporas/mL de *P. ostreatus* a cada tratamiento dos veces por semana respectivamente, excepto al testigo. También se realizó volteos y se mediante pala con movimientos envoltorios para homogenización del inóculo y estimulación de los procesos de biodegradación (Ver Anexo 3 E - G).

2.2.8 Variables de medición

Temperatura: En cada unidad experimental se midió una temperatura mínima y máxima en el interior de la caja todos los días durante 57 días mediante un potenciómetro. Se expresó en unidades °C.

Humedad: En cada unidad experimental se midió una humedad mínima en la mañana y una máxima en la tarde todos los días durante 57 días, mediante un potenciómetro; se expresó en unidades %.

pH: De cada unidad experimental se tomó 5 g de suelo y se le agregó 20 mL de agua destilada y se mezcló hasta homogenizar; luego se introdujo en la dilución la cinta de pH. Este procedimiento se realizó 2 veces a la semana mediante bandas de pH colorimétricas, se expresó en unidades de pH.

Concentración del insecticida: En cada unidad experimental, se tomó 1 kg de suelo y analizó mediante Cromatografía líquida (HPLC) las concentraciones de carbamatos iniciales, finales y la diferencia entre estas se expresaron en $\mu\text{g/g}$ de suelo.

2.3 Fase de Laboratorio

2.3.1 Análisis físico químico de suelo

Este análisis se realizó al inicio y final del proyecto mediante las siguientes metodologías citadas en la Tabla 7.

Tabla 7

Parámetros físicos y químicos

| Parámetros | | Metodología | (Ver Anexo 4) |
|------------|---|--------------------------------|----------------|
| Físicos | Textura y clase textural | Granulométrico- Bouyoucos | |
| | pH del suelo | En agua destilada relación 1:1 | |
| | C.E. | Conductividad eléctrica | |
| Químicos | Materia orgánica | Walkley Back | |
| | <i>P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn,</i> <i>Cu, Zn</i> | Olsen Modificado | |
| | <i>Ca, Mg, K, Na</i> | Acetato de amonio | |

Elaborado por La autora, 2016.

Fuente: (Laboratorio de suelos y Aguas UPS Cayambe, 2016).

2.3.2 Análisis químico analítico

a) Agua

A partir de la extracción líquido – líquido con diclorometano para el agua, consistió en colocar 1000 mL de agua en un embudo de separación con 100 mL de diclorometano. Se observó la separación de las dos fases acuosa y orgánica, se retiró los 200 mL de diclorometano y evaporó el solvente hasta que la muestra llegue a 2 mL y agregó isooctano (Laboratorio de Comisión de Energía Atómica, 2016).

b) Suelo

El procesamiento de la matriz de suelo consistió en tomar 5 g de suelo previamente tamizado y homogenizado en un tubo falcon de 100 mL y se añadió 10 mL del volumen de metanol; se agitó vigorosamente por 2 min en un vortex, en seguida se le colocó en una centrífuga a 3000 rpm durante 5 min. A partir del sobrenadante se filtró 1.5 mL a través de un filtro de membrana de 0.20 µm de PET en un vial de 1.5 mL y se refrigeró a 4 °C para el posterior análisis de HPLC- UV.

La preparación de los estándares y reactivos consistieron que a partir del estándar de carbofurán del Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania) con pureza del 98 %; se diluyó una solución patrón con concentración de 1020 ppm en etil acetato y los niveles de calibración fueron de 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm.

La instrumentación aplicada fue HPLC-UV equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, detector ultravioleta de longitud de onda variable e inyector manual con volumen de inyección de 20 µL. La medida de la columna analítica ODS-2 colocada fue de 35 cm de largo y 5 µ de diámetro; como fase móvil acetonitrilo: agua (60:40) y flujo de 0.8 mL/min; el carbofurán se detectó a 254 nm y registró por un integrador (Valencia, Potosí, Valencia, & Bravo, 2010) (Ver Anexo 5 A-E).

2.3.3 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA); de la casa comercial Difco. También se preparó ácido tartárico como inhibidor del crecimiento de bacteria; cloranfenicol y gentamicina como purificador del crecimiento. El volumen de la preparación fue de 1 L para cada hongo y se basó en protocolos recomendados por la casa comercial como disolver en agua el agar polvo, calentar, agitar y autoclavar (Ver Anexo 6).

2.3.4 Técnicas Microbiológicas.

a) Aislamiento de *T. harzianum*

- Diluciones

Del suelo muestreado del cultivo de papa, cuya localización se mencionó anteriormente, se tomó 10 g de suelo y mezcló con 90 mL de agua peptonada (solución madre) en un frasco Boeco y se homogenizó. A parte se tomó 6 tubos de ensayo cada uno con 9 mL de agua destilada. Desde la solución madre se tomó 1 mL y se colocó en el primer tubo de ensayo con concentración 10^{-1} , se cerró y

agitó; del mismo tubo de ensayo se tomó 1mL hacia el tubo de ensayo 2 con concentración 10^{-2} y así sucesivamente se realizó con los demás tubos de ensayo hasta llegar a la concentración 10^{-6} (Ver Anexo 7 A-B).

- Siembra e Incubación

La técnica placa de fondo fue a partir de cada dilución (10^{-1} hasta 10^{-6}). Se tomó una alícuota de 1000 μ L y trasladó hacia una caja petri respectivamente, sobre la dilución se dispuso el medio de cultivo y se movió la caja petri en forma de “L” hasta que cubra toda la superficie y gelifique el medio de cultivo. Este procedimiento se repitió 6 veces por dilución, consiguiendo (36 cajas petri) en total para el aislamiento de *T. harzianum*. Posteriormente se incubó a 25 °C y 0 luxes por 7 días (Ver Anexo 7 C-D).

- Microcultivo

En la parte interna de una caja petri, se colocó tres porta objetos y encima se ubicó un corte de agar PDA (1x1 cm). Desde una caja petri sembrada con *T. harzianum*, con una asa se tomó esporas del cultivo y se sembró en los bordes del corte de medio de cultivo, se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente se le añadió 2000 μ L de agua estéril en la base interna de la caja petri. Se cerró la caja con parafilm e incubó a 25 °C por 7 días (Ver Anexo 7 E).

- Identificación macroscópica

Se analizó tanto el haz como el envés de las cajas petri sembradas con el hongo para determinar las características macroscópicas como el tamaño de micelio y coloración en su desarrollo. Tomando en cuenta referencias bibliográficas de la taxonomía (España, 2015) (Ver Anexo 7 F).

Además se evaluó el crecimiento radial del micelio en mm y la cinética de *T. harzianum* en 6 siembras durante 10 días (Ver Anexo 7 G-H).

- Identificación microscópica

En un porta objetos se aplicó una gota de azul de laftofenol y fijó un corte de cinta scotch, con las esporas del hongo. Las estructuras observadas (conidióforos, fiálides, conidias) en el lente 100X fueron comparadas e identificadas con la taxonomía de Barnett y referencias bibliográficas (Barnett & Hunter, 1982) (Ver Anexo 7 I).

- Conteo de esporas

Se homogenizó la muestra, hasta eso se colocó un cubre objetos sobre la cámara Neubauer; con una micropipeta se tomó 50 µL y se depositó el líquido en el extremo de la cámara desde la parte lateral por capilaridad, rellenando los dos capilares de la cámara. Luego se colocó en la platina del microscopio, se ubicó la cuadrícula central con el lente 10X y se cuantificó con el de 100X las subcuadrículas de forma ordenada desde el cuadro de arriba hacia abajo (esquinas) y central. En este caso se obtuvo conidias /mL (Ver Anexo 7 J).

La concentración de células por mililitro se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (esporas/mL)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células} * 250\ 000}{\text{n}^{\circ} \text{ de cuadrados contabilizados}}$$

b) Aislamiento de *P. ostreatus*

- Siembra e Incubación

Se sembró la parte interna del sombrero (laminillas) del hongo en el medio PDA, se cerró con parafilm e incubó a 25 °C y 0 luxes por 7 días (Ver Anexo 8 A).

- Purificación

A partir de cajas con la superficie invadida del micelio blanco, se tomaron cortes de (1x1 cm), con pinzas estériles y se flameó los bordes. Luego se sembró el pedazo

con la parte del micelio hacia abajo; se cerró la caja con parafilm e incubó a 25 °C por 7 días (Ver Anexo 8 B-C).

Las identificaciones se hicieron con el mismo procedimiento del anterior hongo; la identificación macroscópica se comprobó con la bibliografía relacionada de Arango, (2010). También se evaluó el crecimiento radial del micelio en mm y la cinética de *P.ostreatus* en 6 siembras durante 15 días (Ver Anexo 8 D-F).

En la caracterización microscópica se identificó estructuras (basidios y basidióforos) comparadas con bibliografía de Saldias (2012).

Mientras que el conteo de esporas se determinó mediante la misma técnica de cámara Neubauer, obteniendo así la concentración de basidios/mL (Ver Anexo 8 G-H).

2.3.5 Preparación del inóculo de hongos

Para los micelios de cada hongo respectivamente; se colocó 1 L de agua destilada a temperatura ambiente en un recipiente limpio. Para el tratamiento T1 de *T. harzianum* se tomaron 10 cajas petri puras con esporas en estadio juvenil y con un bisturí se cortó el medio de cultivo, e introdujo en el recipiente; se agitó vigorosamente durante 5 min. A continuación se tamizó el líquido de color verde quedando las esporas suspendidas. El mismo procedimiento ocurrió para el tratamiento T2 con las 10 cajas petri de *P.ostreatus*; y para el tratamiento T3 tomando en cuenta la asociación de los hongos, es decir 10 cajas de *T. harzianum* más 10 cajas de *P.ostreatus*.

Capítulo 3: Resultados y Discusión

3.1 Diagnóstico del terreno del cultivo de papa.

Tabla 8

Movilidad y toxicidad de carbofurán según PIRI.

| Análisis de PIRI CSIRO para carbofurán | | | | |
|--|-------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Potenciales | Agua contenida en suelo | | | |
| | SW | Categoría de riesgo (color) | GW | Categoría de riesgo (color) |
| Movilidad (%) | 1.6 | Alto | 1.1×10^{-5} | Muy Alta |
| Toxicidad (%) | 0.2 | Mediana | 1.6×10^{-6} | Alto |

Nota: SW: aguas superficiales; GW aguas subterráneas.

Fuente: PIRI CSIRO (2016).

Elaborado por La autora, 2016.

En la tabla 8, se observa la evaluación de los valores potenciales de movilidad y de toxicidad obtenidos por PIRI Csiro Software aplicados en aguas contenidas en el suelo de cultivo de papa en base a las características ambientales de la zona (Ver Anexo 9 A). Según PIRI CSIRO (2016), las aguas superficiales presentan una movilidad de 1.6 %, correspondiente a un alto riesgo, y una toxicidad de 0.2 % como mediano riesgo. En tanto que las aguas subterráneas presentan una movilidad de 1.1×10^{-5} % con riesgo equivalente a muy alto y una toxicidad de 1.6×10^{-6} % como alto riesgo.

PIRI en base a datos (Ver Anexo 9 B) se puede ver que influencia en la movilidad del pesticida en el suelo y muestra una idea clara de cómo los factores ambientales (temperatura, humedad, precipitación, horas luz, viento) inciden directamente en el perfil del suelo, presentando un riesgo alto y ocasionando impactos a futuro como daño al recurso suelo, contaminación del recurso agua, disminución de fertilidad, alteración de la estructura de suelo, disminución de la microflora y microfauna del suelo, entre otros.

Así carbofurán se considera como un insecticida soluble, persistente, móvil y presenta una adsorción moderada hacia los primeros niveles de suelo, como se muestra en nuestro caso la concentración es alta (Ver Anexo 10 A y B); por lo que posiblemente sea retenida en los enlaces de las partículas de materia orgánica, siendo importante la textura del suelo para el comportamiento del insecticida en su movilidad. De igual forma tiene una alta lixiviación por la transición del insecticida en el suelo cuya textura es franco arenoso, el cual facilita la adsorción por el tamaño de su partícula entre 0.0625-2 mm.

En el estudio “Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales” realizado por Cortés (2011) menciona que a mayor solubilidad se puede transportar a mantos acuíferos, lixiviar hacia aguas contenidas en el suelo, dependiendo del mismo y de parámetros para la degradación tomando en cuenta que los metabolitos sean menos tóxicos.

En una investigación similar, reportada por Valencia, Potosí, Valencia & Bravo (2010), obtuvieron resultados en que la movilidad de carbofurán se ve favorecida por factores externos como la pendiente de 40 %, la textura arenoso-franco del suelo, la elevada solubilidad en agua de 32 mg/L a 25°C y su coeficiente de retardo entre 1.2-1.4 para la contaminación de cuerpos de agua subterráneas o superficiales.

La toxicidad del pesticida va a depender de la movilidad a través del tipo de suelo en que se encuentre, persistencia, frecuencia de uso y aplicación del insecticida, condiciones de aplicación, tipo de equipos utilizados, ingrediente activo, condiciones ambientales que ocasionan impactos tanto al medio ambiente, como los recursos y la salud humana. La persistencia de carbofurán depende de los factores mencionados

anteriormente, volviéndolo un producto de toxicidad media a alta que puede causar problemas ambientales.

La FAO (2016), la vida media de carbofurán entre los 30 y 120 días puede referirse a que sus metabolitos mantengan su persistencia como 3-hidroxicarbofuran, 3-cetocarbofuran y carbofuran-fenol los mismos que permanecen en el suelo sin conocer su tiempo de degradación y aumentando de la toxicidad. Por otra parte Narváez, Palacio & Molina (2012) mencionan que pese a la biodegradación, fotodegradación e hidrólisis química y otros parámetros puede disminuir o no la persistencia.

De esta forma se puede estimar la evidencia de toxicidad de algunos productos de transformación que pueden incrementar la bioacumulación y toxicidad que las moléculas parentales.

Con esta información se puede corroborar que el pesticida por su alta movilidad y su toxicidad mediana a alta, posiblemente tiende a aparecer en recursos cercanos como es en este caso acumularse en el agua (Ver Anexo 10 D); en el tubérculo con 0.54 mg/kg según el análisis realizado del tubérculo (Ver Anexo 10 E), cuyo valor supera el 0.01 mg/kg como límite permisible, lo que muestra que el carbofurán se adsorbe en el producto de consumo teniendo un alimento peligroso para el consumo humano, pese a ser uno de los alimentos de primera necesidad, se inmiscuiría en la afección de la salud y enfermedades a futuro.

Según la Comisión Europea (2016) menciona que el límite permisible es de 0.01 mg/kg, de acuerdo a la ratificación antes descrita, se puede decir que posiblemente los cultivos de papa de otros sectores del país no superen el límite permisible puesto que el cultivo no es permanente, por lo que el dato obtenido es de una de las zonas paperas


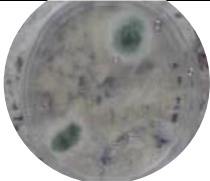

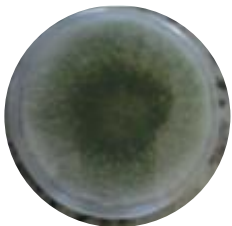
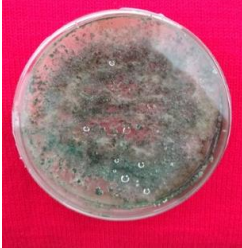

del Ecuador donde se conoce que el uso de los pesticidas en general no es bien manejado.

3.2 Aislamiento de hongos.

a) *T. harzianum*

Tabla 9

Características macroscópicas del haz y envés de *T. harzianum*

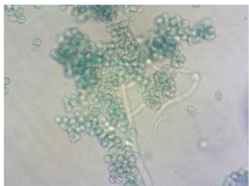

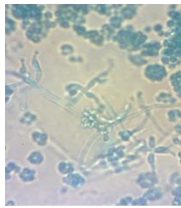
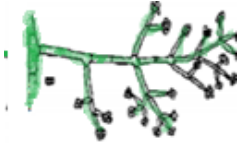
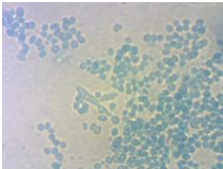

| | Resultados | Referencia Bibliográfica |
|---|---|--|
| A Formación de anillos concéntricos |  <p>Elaborado por La autora, 2016.</p> |  <p>Fuente: (España, 2015)</p> |
| B Coloración del micelio |  <p>Elaborado por La autora, 2016.</p> |  <p>Fuente: (España, 2015)</p> |
| C Distribución sobre la superficie del medio |  <p>Elaborado por La autora, 2016.</p> |  <p>Fuente: (España, 2015)</p> |

En la Tabla 9 se ilustra las características evaluadas en la identificación macroscópica, en la columna izquierda se presenta lo observado en el laboratorio: en el haz de la caja petri la formación de anillos concéntricos de 8 mm de diámetro a los 2 días y de color verde; e n el envés la coloración del micelio blanco verdoso y su distribución sobre la superficie muy homogénea, que comparada con la columna derecha de la

literatura de España (2015) quien menciona que los anillos son concéntricos con diámetro de 6 mm obtenidos a los 3 días con una coloración blanca – verdosa en el desarrollo completo del hongo y la distribución uniforme en toda la superficie de la caja. Al analizar las dos columnas se pudo comprobar que las características observadas son iguales a las del autor, confirmándose así que el hongo observado es *T. harzianum*.

Tabla 10

Características microscópicas de *T. harzianum*.

| | Resultados | Referencia bibliográfica |
|---------------------------------|---|---|
| A Conidióforos |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Barnett & Hunter, 1982) |
| B Fiálides |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Barnett & Hunter, 1982) |
| C Conidias |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Barnett & Hunter, 1982) |

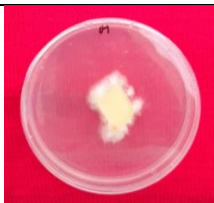
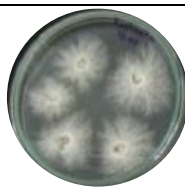

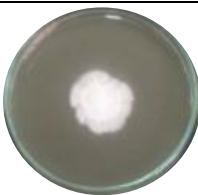


Según la Tabla 10 se observa las características microscópicas en dos columnas. En la columna izquierda, se muestra las estructuras obtenidas en el laboratorio como conidióforos ramificados en forma piramidal verdosas, fiálides (ramificaciones laterales) y conidias esféricas de color verde. Las estructuras al ser comparadas con la taxonomía de Barnett & Hunter (1982) como referencia para la identificación,

presentan hifas hialinas y septadas con conidióforos hialinos en forma piramidal complejos y ramificados. Las fiálides hialinas con mayor ancho en la base, asociadas a los conidióforos en ángulo recto, pueden estar solas o en racimo. Las conidias o esporas unicelulares en forma ovalada y verdosa. De esta forma se comprueba que el hongo es el mismo que describe el autor.

b) *P. ostreatus*

Tabla 11

Características macroscópicas del haz y envés de la caja petri por *P. ostreatus*

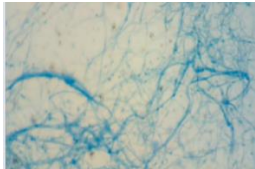



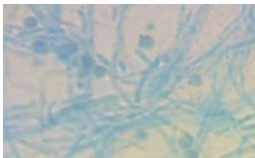

| | Resultados | Identificación bibliográfica |
|---|---|---|
| A Formación de anillos concéntricos |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Arango, 2010). |
| B Coloración del micelio |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Arango, 2010). |
| C Distribución sobre la superficie del medio |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Arango, 2010). |

En la Tabla 11, se ilustra las características macroscópicas obtenidas en laboratorio, en la columna de izquierda se encuentra la formación de anillos concéntricos

algodonosos y blancos en el haz, la coloración se mantiene durante su desarrollo; en el envés la distribución del micelio es plana, blanca y algodonosa sobre la superficie de la caja. En la columna derecha se encuentra la referencia bibliográfica descrita por Arango (2010) en la que se ve la formación de anillos concéntricos con similitud al algodón, a partir de la siembra su distribución completa del micelio blanco, algodonoso y plano. De esta manera se manifiesta el aislamiento y obtención pura del micelio de *P. ostreatus*.

Tabla 12

Características microscópicas de *P. ostreatus*

| Resultados | | Identificación bibliográfica |
|----------------------------------|---|---|
| A Hifas |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Saldias, 2012). |
| B Basidios |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Saldias, 2012). |
| C Basidiosporas |  Elaborado por La autora, 2016. |  Fuente: (Saldias, 2012). |

Según la tabla 12, se observa las estructuras microscópicas del micelio, en la columna izquierda se encuentran las hifas septadas blanquecinas, los basidios con forma de pedestal contienen las basidiosporas circulares y blancas. Al comparar con la columna derecha de la referencia bibliográfica, Saldias (2012) describe las hifas de paredes delgadas con fíbulas y septos; al término de estas se forman los basidios en forma de

copa como se muestra en la segunda imagen de la columna derecha y en la punta de estas copas se encuentran las basidiosporas circulares. Cabe ratificar que las estructuras observadas pertenecen al Phylum basidiomycota correspondiente a *P. ostreatus*.

3.3 Variables medidas

a) Concentraciones de carbofurán

Tabla 13

Concentraciones promedio, CV y rangos de significancia.

| Tratamientos | Concentración inicial (µg/g) | Concentración final (µg/g) | Diferencia de concentraciones (µg/g) | Promedios (µg/g) | Porcentaje de degradación |
|--------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------|---------------------------|
| ToR1 | 6632 | 3375 | 3257 | 3381.8C | 51% |
| ToR2 | | 3157 | 3475 | | |
| ToR3 | | 3280 | 3352 | | |
| ToR4 | | 3189 | 3443 | | |
| T1R1 | | 2459 | 4173 | 4170.5A | 63% |
| T1R2 | | 2371 | 4261 | | |
| T1R3 | | 2591 | 4041 | | |
| T1R4 | | 2425 | 4207 | | |
| T2R1 | | 2977 | 3655 | 3753.8B | 53% |
| T2R2 | | 2706 | 3926 | | |
| T2R3 | | 2863 | 3769 | | |
| T2R4 | | 2967 | 3665 | | |
| T3R1 | | 2766 | 3866 | 4067.5AB | 62% |
| T3R2 | | 2461 | 4171 | | |
| T3R3 | | 2752 | 3880 | | |
| T3R4 | | 2279 | 4353 | | |

Nota: A, AB, B, C: rangos.

Fuente: Infostat (2016).

Elaborado por La autora, 2016.

Según la Tabla 13, se observa las concentraciones de carbofurán en las muestras de suelo al inicio, final y la diferencia entre estas en µg/g. Los tratamientos se expresan en el siguiente orden: A para el T1 (Suelo + insecticida + *T. harzianum*) con 4170.5

µg/g que corresponde al 63 % de degradación, seguido de AB para T3 (Suelo + insecticida + *T. harzianum* + *P. ostreatus*) con 4067.5 µg /g y 62 % de degradación, B para T2 (Suelo + insecticida + *P. ostreatus*) con 3753.7 µg/g y 53 % de degradación; en último lugar C para T0 (Suelo + insecticida) con 3382 µg /g al 51 % de degradación.

Las concentraciones obtenidas por HPLC se pueden ver en el Anexo 10 C con la altura y tiempo de retención de cada uno de ellos.

El comportamiento destacable de T1 posiblemente se debe al uso y aplicación de esporas viables, lo que permitió que el metabolismo se dé más rápido y degrade de manera eficiente el carbofurán. Además el comportamiento de las variables pese a no ser las óptimas, incentivaron en el proceso de degradación, resaltando que el pH presentó la misma significancia y clasificación de rangos. Esto acompañado por condiciones del ensayo como: 19b °C, 79 % de humedad, pH de 6, 12h lux/12h oscuridad, volteos e inoculaciones con un promedio de 38.3×10^6 conidias/mL las mismas que aportaron con la degradación del insecticida, pero que pueden variar según el tipo de suelo y la zona donde se realice.

En la presente investigación, la aplicación del género *Trichoderma* como tratamiento, beneficio la descontaminación del suelo gracias al sistema enzimático en alerta a la molécula del insecticida; como se vio en el estudio de Islas, y otros (2013) en el que mencionan que la biodegradación se da a conocer por la reacción del sistema celular de intoxicación fundamentado en la fabricación de permeasas ya que, el género soporta concentraciones de hasta 10000 mg/L de un plaguicida, mostrando de esta manera que *T. harzianum* es apto a la degradación de carbofurán en concentraciones de 6632 µg/g en 57 días.

El resultado de degradación adquirido por Islas, y otros (2013) degradó el 89 % de atrazina en 40 días, lo que indica que los resultados son mayores en menor tiempo sabiendo que el herbicida fue fuente primordial de C-N. En cambio los datos que se reporta en base al T1 degradó el 63 % de carbofurán en 57 días, demostrándose en el suelo la diferencia de cantidad del inicial 0.13% de N y final 0.35% de N, (Ver Anexo 10 F-G) considerándolo como alto porque la molécula del insecticida posee NO_3 (anión de nitrato), siendo mineralizado como una posible fuente de nitrato.

Además, se puede corroborar la interacción de *Trichoderma* con otros macro y micronutrientes por lo que son mineralizados en conveniencia del mismo. Es así como, los estudios de Hoyos, Cardona, Osorio & Orduz (2015) y Singh, Singh, Singh & Rakshit (2014) indican los elementos que mayor afinidad e incremento tiene este género: N, P, K, Ca, Mg Zn, Mn, Cu y Fe, es por ello que variaron los valores del inicial y final.

Otro punto a destacar es que pese a que no haya estudios con respecto a este tipo de insecticidas, se toma en cuenta el comportamiento de este género frente a otros agroquímicos de composición similar como es el estudio de Tripathi y otros (2013) en el que se refiere a la degradación de DDT, dieldrin, endosulfan, pentacloronitrobenceno por *T. harzianum* mediante la bioaumentación del mismo. Así también Islas y otros (2013) en su estudio alude con la importancia de la inoculación en concentraciones 10^4 - 10^5 UFC/mL. Se puede estimar que la bioaumentación del hongo con concentración promedio del inóculo 38.3×10^6 conidias/mL e incluso la aireación fue favorable para el tratamiento.

Por lo tanto *T. harzianum* pese a no haber tenido variables óptimas degradó con un porcentaje considerable frente a la concentración inicial de carbofurán; es decir que su

mecanismo de acción en cuanto a tolerar y degradar sustancias orgánicas a tan elevadas concentraciones permite la activación y mecanismo de defensa.

Ante los datos mencionados, se puede decir que la hipótesis alternativa se acepta: Los hongos en estudio biodegradan insecticidas carbamatos.

b) Temperaturas

Tabla 14

Temperaturas promedio, CV y rangos de significancia.

| CV (%) | <i>p-valor</i> (%) | SIGNIFIC | PROMEDIO Y RANGO | | |
|--------|--------------------|----------|------------------|------|---|
| | | | T0 | 15.2 | A |
| 0.3 | 38.0 | NS | T3 | 15.2 | A |
| | | | T1 | 15.1 | A |
| | | | T2 | 15.1 | A |
| | | | | | |

Nota: CV: Coeficiente de variación; NS: No significativa; A: rango

Fuente: Infostat (2016).

Elaborado por La autora, 2016.

En la tabla 14, se ilustra las temperaturas promedio para los tratamientos: T0 y T3 con una temperatura de 15.2 °C, seguido de T1 y T2 con 15.1 °C. Todos estos se encuentran en el rango A, con un *p-valor* de 38.0 % lo que significa que son iguales y son estadísticamente no significativas, el CV es de 0.3 % (Ver Anexo 10 H), el mismo que es válido ya que se encuentra dentro del valor establecido hasta 10 % para este tipo de ensayos, lo que da confiabilidad a los datos obtenidos.

La temperatura es un factor importante dentro de la biorremediación que oscila entre 25-35 °C para el desarrollo micelial de microorganismos a través de la actividad enzimática, por lo que a mayor temperatura, mayor degradación; por lo tanto favorece

las reacciones de hidrólisis, oxidación y cometabolismo, como es en el caso de *T. harzianum* y *P.ostreatus* frente a una concentración elevada de carbofurán.

Las temperaturas en el suelo se mantuvieron durante el ensayo posiblemente porque hubo un control de las condiciones de manejo del experimento, por ende la variación fue mínima.

Por lo tanto, T1 se desarrolló en temperaturas de 12 a 18 °C durante el ensayo que a pesar de no ser el rango mencionado en la literatura, el hongo degradó al insecticida en un 63 % en 57 días, lo que demuestra ser un microorganismo apto a varios rangos de temperatura para trabajar en biorremediación.

Según Knudsen & Bin (1990) mencionan que *T. harzianum* trabaja en una temperatura entre 25-30 °C pero aun así crece a 20 °C en 14 días con una posible alteración en el mecanismo de acción, viabilidad del hongo o tiempo en su crecimiento. Balamurugan, Ramakrishnan, Senthilkumar & Ignacimuthu (2010) en su estudio verifica que a condiciones óptimas aumenta la biodegradación y sucede en menor tiempo; es decir la temperatura a la cual se trabajó fue cercana a la citada por la literatura.

Para *P.ostreatus*, Suáres (2010) recomienda en su estudio una temperatura óptima de 25 °C para un crecimiento y mecanismo de acción viable en cualquier sustrato. En otro estudio coincide que las temperaturas menores de 30.8 °C el hongo es inhibido en todos sus mecanismos de acción (Coello , 2011).

Mientras que para T2 las temperaturas están por debajo de las recomendadas para su desarrollo y metabolismo porque lo que posiblemente *P.ostreatus* degradó al insecticida y obtuvo un porcentaje más bajo de degradación comparado con *T. harzianum*.

Ante los datos mencionados, se puede decir que la hipótesis alternativa se acepta: Los hongos en estudio biodegradan insecticidas carbamatos.

c) Humedad

Tabla 15

Humedades promedio, CV y rangos de significancia.

| CV (%) | p-valor (%) | SIGNIFIC | PROMEDIO Y RANGO | | |
|--------|-------------|----------|------------------|------|---|
| | | | T2 | 74.5 | A |
| 1.1 | 42.6 | NS | T1 | 74.0 | A |
| | | | T3 | 73.8 | A |
| | | | T0 | 73.5 | A |

Nota: A: rango; CV: Coeficiente de variación; NS: No significancia.

Fuente: Infostat (2016).

Elaborado por La autora, 2016.

En la tabla 15, se observa los tratamientos en el siguiente orden: T2 con 74.5 %, seguido de T1 con 74.0 %, T3 con 73.8 % y T0 con 73.5 %. Y se mantienen en el rango A lo que significa que son iguales. El CV de 1.1 % que está dentro del valor permitido, demuestra la confiabilidad de los datos obtenidos. De acuerdo al p-valor de 42.6 % el cual indica no significancia estadística entre estos tratamientos (Ver Anexo 10 H).

La humedad es un parámetro importante debido a la necesidad de agua para el transporte de nutrientes y constituyentes orgánicos a la célula microbiana; como en el caso de *T. harzianum* que absorbe tanto macronutrientes y micronutrientes para su desarrollo y metabolismo.

Durante el ensayo las humedades fluctúan entre 73- 74 %, debido a que el suelo con pesticida se secaba rápidamente y se añadió en constancia el inóculo de los hongos;

los mismos valores están dentro de los citados por bibliografía (50-80 %) para un proceso de biorremediación; es por eso que esta variable a los datos en mención no afectó a los microorganismos, sino que posiblemente demoró el tiempo de degradación y disminuyó el porcentaje.

Conforme al estudio de Velasco & Sepúlveda (2009) para procesos de biorremediación de suelo la humedad fluctúa entre 50 y 80 %, dependiendo de las propiedades del suelo y condiciones ambientales para un buen metabolismo del hongo, facilitando el proceso; pero debido al uso de microorganismos es necesario conocer sus parámetros. Aunque los estudios son pocos con respecto a este tipo de insecticidas; Stamatiu (2013), Argumedo, Alarcón, Ferreta-Cerrato & Peña-Cabriales (2009) y Martínez, Infante & Reyes (2013) detallan que el género *Trichoderma* se estabiliza en 60 % de humedad en el suelo por lo que alrededor de este porcentaje puede biorremediar el 90 % de concentraciones altas de insecticidas.

De esta forma se puede decir que *T.harzianum* pese a tener una humedad alta con respecto al valor recomendado, realizó un proceso de biodegradación del 63 % en 57 días, es decir que la humedad del T1 a la cual se trabajó no influyó en el proceso de biodegradación.

Con respecto a *P.ostreatus*, el estudio de Sánchez, Orozco, Hernández, Nieto & Márquez (2006) estima que la aplicación de un *Pleurotus* al 70 % de humedad degrada hasta un 89.9 % de 65 ppm iniciales de endosulfán.

Pese a que T2 superó la humedad de 74.5 % puede que haya modificado la actividad enzimática pero aun así se observa que biodegradó eficazmente en un 53 %, es decir que a pesar de no estar en condiciones óptimas continuo procesando el contaminante.

d) Potencial de hidrógeno (pH)

Tabla 16

Potencial de hidrogeno promedio, CV y rangos de significancia.

| CV (%) | <i>p</i> -valor (%) | SIGNIFIC | PROMEDIO Y RANGO | | |
|--------|---------------------|----------|------------------|-----|----|
| | | | T1 | 6.7 | A |
| 2.6 | 0.01 | ** | T3 | 6.5 | AB |
| | | | T2 | 6.2 | B |
| | | | T0 | 5.5 | C |

Nota: A, AB, B, C: rangos; CV: Coeficiente de variación; **: alta significancia

Fuente: Infostat (2016).

Elaborado por La autora, 2016.

En la Tabla 16, se observa que los tratamientos presentan diferentes rangos y en orden descendente están de la siguiente manera: T1 con 6.7 en rango A, T3 con 6.5 y rango AB, T2 con 6.2 cuyo rango es B y T0 con 5.5 y rango C.

El CV es de 2.6 % y un *p*-valor de 0.01 % demuestran la confiabilidad por lo que se comprende que los datos son estadísticamente significativos.

El pH es otro de los parámetros importantes ya que los mecanismos de acción y la asimilación de nutrientes se potencializan cuando los microorganismos se encuentran en condiciones óptimas, tanto para producción de enzimas como para la reacción de las mismas. De esta manera en el ensayo se puede ver que los valores de pH iniciaron en ácido y terminan como ligeramente ácido posiblemente por la acción de los hongos en el suelo.

T1, T2 y T3 presentan pHs ligeramente ácidos a pesar de que se recomienda rangos entre (6-8). También se puede ver que posiblemente hubo un aporte o influencia de nutrientes del suelo como fuente de alimentación y energía para los microorganismos.

T1, en la relación de nutrientes y microorganismo para la degradación del insecticida, tiene mayor afinidad e incremento hacia: N, P, K sin dejar a un lado otros micronutrientes que ayudan al proceso regulatorio de la pared celular, así como para la obtención de iones fácilmente asimilables, como se puede ver en el análisis físico químico del suelo (Ver Anexo 10 F-G).

Por otra parte Cholango (2009) indica que *T. harzianum* biodegrada entre pHs de neutro a ácido; y otro estudio de Islas y otros (2013) reporta la biodegradación del 89% de atrazina a un pH de 4.5 y 7.5 por el mismo hongo.

T. harzianum a un pH ácido degradó el 63 % de insecticida en 57 días en condiciones aerobias, por los valores antes mencionados de pH, están dentro del rango para el proceso de biorremediación entre 6-8 recomendados por Valencia y otros (2010). Por lo tanto esta variable influyó en el estímulo de la biodegradación de los tratamientos frente al insecticida ya que el T0 no se le aumentó microorganismos y mantuvo un pH de 5.5 considerado como ácido durante el tiempo transcurrido.

De tal forma que las condiciones en las que se trabajó aunque no fueron óptimas estuvieron dentro del rango para un proceso de biorremediación, tomando en cuenta que la variable con mayor incidencia y estímulo en la biodegradación fue el pH. Debido a lo cual se cumple la hipótesis alternativa: Los hongos en estudio biodegradan insecticidas carbamatos.

Conclusiones

- Mediante la aplicación de PIRI Csiro software se pudo determinar una categorización en términos potenciales de toxicidad y movilidad en base a las características específicas del suelo.
- Se determina que el plaguicida carbofuran lamentablemente aún sigue siendo aplicado en cultivos agrícolas de papa en la región norte del Carchi, lo cual evidencia la falta de información en los agricultores y los riesgos tóxicos potenciales que pueden ocasionar en los diversos tipos de entes biológicos de su entorno.
- Se establece que a través del aislamiento de esporas, la obtención de los hongos a nivel de laboratorio fue en menor tiempo del citado en la bibliografía, ya que *T. harzianum* evidencia una concentración de 38.3×10^6 conidias/mL en 7 días; mostrando un mejor desarrollo que *P. ostreatus* con una concentración de *P.ostreatus* de 36.3×10^6 basidiosporas/mL en 8 días; puesto que hubo control de condiciones de laboratorio y medición de cinética de estos organismos.
- Se determina que el tratamiento T1, compuesto por *T. harzianum* biodegrada un 63 % de carbofurán en 57 días, prácticamente degrada en menor tiempo de vida media del mismo insecticida (120 días), por ende es un microorganismo eficiente y apto para remediación.
- Se establece que las condiciones de temperatura, humedad y pH controladas son importantes para la acción del mecanismo de biodegradación y activación enzimática; y si al optimizarlas aumenta el proceso en porcentaje de degradación y en menor tiempo.

Recomendaciones

- Aplicar el programa PIRI Csiro software para una estimación real en cuanto a los riesgos de plaguicidas aplicados en campo.
- Emplear los microorganismos autóctonos en la bioaumentación facilita y presenta una remediación eficiente.
- Controlar y optimizar las condiciones ambientales necesarias para los microorganismos ya a que mejores condiciones, el proceso de biodegradación será más rápido.
- Fortalecer el estudio de la actividad catalítica y enzimática de los microorganismos aplicados en biorremediación, para posibles productos en futuro.

Bibliografía

- AGROCALIDAD. (20 de Marzo de 2003). *AGROCALIDAD*. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/Registro-Insumos-Agropecuarios/normativa/Decreto-3609.pdf>
- AGROCALIDAD. (20 y 21 de Mayo de 2008). *AGROCALIDAD*. Obtenido de *AGROCALIDAD*: http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/pdfs/registro_de_insumos/DECISION_684.pdf
- Aguilar, N. (2012). Evaluación del crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* y *Pleurotus ostreatus* en dos sustratos bajo condiciones naturales en la granja el Hangar del Municipio de Piedecuesta (Santander). Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- 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". *Uso de insecticidas en el cultivo de papa (Solanum tuberosum), por los socios de la corporación de asociaciones agropecuarias del cantón Quero "COAGRO-Q"*. Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- Alegria, J. R. (5 de Junio de 2013). Biotecnología y Biorremediación. *Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática*. El Salvador.
- Arango, C. (2010). Obtención *in vitro* de micelio de hongos comestibles, shitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonaris*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

- Argumedo, D., Alarcón, A., Ferreta-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación ambiental*, 257-269.
- Arriaza, S. L. (17 de Febrero de 2005). Evaluación de exposición ocupacional a plaguicidas organofosforados en trabajadores de un laboratorio de análisis de formulaciones de plaguicidas y propuesta de guía de seguridad y control ocupacional. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Aquilla, B. (2015). Efectos colinesterasicos y contaminación del agua causados por el uso de plaguicidas en zonas agrícolas del cantón San Isabel. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Balamurugan, K., Ramakrishnan, M., Senthilkumar, R., & Ignacimuthu, S. (2010). Biodegradation of methyl parathion and monochrotophos by *Pseudomonas aeuroginosa* and *Trichoderma viridae*. *Asian Journal of Science and Tecnhnology*, 123-126. Obtenido de <http://journalajst.com/sites/default/files/1043%20Download.pdf>
- Barnett, H., & Hunter, B. (1982). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Mineapolis, Minesota: Burguess publishing.
- Barr, D., & Aust, S. (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*, 78A-87A.
- Betancur, B. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con el pesticida 1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano (DDT) mediante protocolos de bioestimulación y adición de surfactante. Medellin, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

- Bouaid, A. (2008). *Nuevos métodos de tratamiento de muestra para la preconcentración, estabilización y determinación de pesticidas por cromatografía de gases*. Madrid: ES: Universidad Complutense de Madrid.
- Briceño, A., Encinas, O., Mohali, S., Mora, N., & Molina, Y. (2008). Biopreservantes contra la mancha azul de la madera pino caribe. *Revista Forestal venezolana*, 143-148.
- Camargo, A. (07 de Mayo de 2016). *Campus Virtual Facultad de Ciencias Agrarias - UNCuyo*. Obtenido de Toxicología de plaguicidas: campus.fca.uncu.edu.ar/.../TOXICOLOGÍA%20DE%20PLAGUICIDAS
- Cañizares-Villanueva, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 131–143.
- Carrillo, L., & Audisio, C. (2007). *Manual de microbiología de los alimentos*. San Salvador de Jujuy : Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias.
- Cholango, L. P. (19 de Mayo de 2009). Selección de cepas de *Trichoderma sp. in vitro*, para el control de problemas radiculares en flores de verano. Checa-Ecuador. Sangolqui, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
- Coello, J. (2011). Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Escuela superior politecnica del Litoral*. Guayaquil, Ecuador.
- Comisión Europea. (2016). *Plants EU Pesticides database*. Obtenido de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN>

Constitución Política de la República del Ecuador. (20 de Octubre de 2008).

Constitución Política de la República del Ecuador. Obtenido de <http://pdba.georgetown.edu/Parties/Ecuador/Leyes/constitucion.pdf>

Cortés, H. N. (Noviembre de 2011). Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales. Universidad Veracruzana. Obtenido de <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30882/1/CortesNicolas.pdf>

Del Puerto Rodríguez, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM)*, Pg 3-14.

Difco. (2012). *Difco*. Obtenido de https://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobblmanual_2nded_lowres.pdf

España, C. K. (Mayo de 2015). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma spp.* como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de Raygrass (*Lolium perenne*) y Trébol blanco (*Trifolium repens*) en la hacienda "La Alegría" cantón Pedro Moncayo. 36 - 37. Quito, Ecuador: Repositorio UPS.

FAO. (1998). *ECOLEX*. Obtenido de <http://www.ecolex.org/es/details/legislation/decision-no-436-norma-andina-para-el-registro-y-control-de-plaguicidas-quimicos-de-uso-agricola-lex-faoc018921/>

- FAO. (Enero de 2016). *Depósito de documentos de la FAO*. Obtenido de Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/docrep/005/x2570s/X2570S08.htm>
- Flores, V. M. (2015). Determinación del efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma spp.* frente a *Mycosphaerella fijiensis* en plantas de banano a nivel de invernadero. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Gafar, M. O., Dagash, M. I., Elhag, A. Z., & Hassan, Y. O. (2011). Residual Effect of Malathion (Organophosphate) and Sevin (Carbamate) application on potato (*Solanum tuberosum*). *American Journal of Experimental Agriculture*, 226-230.
- Gao, J., Ellis, L., & Wackett, L. (Enero de 2010). *La Universidad de Minnesota biocatálisis base de datos/Biodegradación: mejorar el acceso público Nucleic Acids Research 38 : D488-D491*. Obtenido de http://eawag-bbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=p&pathway_abbr=cbf
- García-Riviero, M., & Peralta, M. (2008). Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1-12.
- González, P. M. (2009). *Biorremediación y tratamiento de efluentes*. Córdoba: AR: El Cid Editor.
- Google map. (2016). *Google map*. Obtenido de Google map: www.google.com.ec
- Gray, R. A. (1971). Behavior, persistence, and degradation of carbamate and thio-carbamate herbicides in the environment. *Proceedings of the California Weed*

Control cONFERENCE (págs. 128-143). California: Stauffer Western Research Centre.

Hoyos, L., Cardona, A., Osorio, W., & Orduz, S. (2015). Efecto de diversos aislamientos de *Trichoderma spp.* en la absorción de nutrientes en frijol (*Phaseolus vulgaris*) en dos tipos de suelo. *Ciencia Hortícola*, 268- 278.

INEC. (2013). *ecuadorencifras*. Obtenido de Módulo Ambiental Uso de Plaguicidas en la Agricultura 2013: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2013/Documento_Tecnico-Uso_de_Plaguicidas_en_la_Agricultura_2013.pdf

INEC. (2014). *ecuadorencifras*. Obtenido de Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014-2015/2014/Informe%20ejecutivo%20ESPAC%202014.pdf

INEC. (2014). *Instituto Nacional de Estadística y censos*. Obtenido de Uso y manejo de Agroquímicos en la Agricultura 2014: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2014/Modulo_Uso_y_Manejo_de_Agroquimicos.pdf

Infostat. (17 de Noviembre de 2016). Infostat. *Programa Estadístico Infostat*.

IPCS . (1986). *Programa Internacional de Seguridad Química* . Obtenido de [file:///C:/Users/HP/Desktop/TESIS%20CARBAMATOS/carbamatos_%20una%20introducci%C3%B3n%20general%20\(EHC%2064,%201986\).html](file:///C:/Users/HP/Desktop/TESIS%20CARBAMATOS/carbamatos_%20una%20introducci%C3%B3n%20general%20(EHC%2064,%201986).html)

- Islas, M., Villagómez, J. R., Madariaga, A., Castro, J., González, C. A., & Acevedo, O. A. (2013). Biorremediation perspectives using autochthonous species of *Trichoderma* sp. for degradation of atrazine in agricultural soil from the Tulancingo Valley, Hidalgo, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 265-276.
- Knudsen, G. R., & Bin, L. (1990). Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. *Phytopathology* 80(8), 724-727.
- Laboratorio de Comisión de Energía Atómica. (2016). Análisis de insecticidas en muestras de agua. Quito, Ecuador.
- Laboratorio de suelos y Aguas UPS Cayambe. (2016). Metodologías de parametros físicos químicos. Cayambe, Ecuador.
- MAE. (7 de Abril de 2015). *Ministerio del Ambiente Ecuatoriano*. Obtenido de Sitio web de INSIGMA Cia Ltda: <http://insigma.com.ec/acuerdo-ministerial-028-libro-vi-tulsma/>
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg*, 1-11.
- Meleiro, A. L., Zelayarán, G., Kasemodel, M. C., & Nitschke, M. (2011). Pesticides in the modern world - Pesticides Use and Management. *Biodegradation of Pesticides*. Brazil: Universidade de Sao Paulo, Instituto de Química de Sao Carlos.
- Narváez, J. F., Palacio, J. A., & Molina, F. J. (2012). Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad. *Revista Gestion y Ambiente*, 27-38.

- Noboa, G. P., & Quelal, A. D. (2015). *Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de Beauveria bassiana y Trichoderma harzianum como aporte a los productores de café orgánico de la asociación "Rio Intag" Cantón Cotacachi*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Parraguez, D. (2013). *Evaluación del cumplimiento de la medida de gestión implementada: "Prohibición de los pesticidas Organoclorados (POCs)" en el suelo agrícola, del valle de Aconcagua, provincia de San Felipe, VRegión, Chile*. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Perez, B. J. (Mayo de 2006). Descripción de las características macroscópicas, de cultivo *in vitro* de cepas de *Pleurotus* aisladas en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- PIRI CSIRO. (1 de Diciembre de 2016). *Pesticide Impact Rating Index*. Obtenido de <http://www.csiro.au/en/Research/LWF/Areas/Environmental-contaminants/Contaminant-chemistry/PIRI>
- PLAGSALUD. (2005). Obtenido de Curso de Autoinstrucción en diagnóstico, tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas: <http://www.bvsde.paho.org/tutorial2/e/unidad2/>
- PLAN NACIONAL DEL BUEN VIVIR . (7 de Octubre de 2013). *Consulado del Ecuador en el reino de los países bajos*. Obtenido de PLAN NACIONAL DEL BUEN VIVIR 2013 - 2017: <http://www.embassyecuador.eu/site/index.php/es/noticias-2/216-plan-nacional-del-buen-vivir-2013-2017>

PQBio. (Diciembre de 2015). *Por qué Biotecnología*. Obtenido de Biorremediación: Organismos que limpian el ambiente: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/>

Proaño, M. C. (Octubre de 2011). Estudio cinético de la obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninilítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 en rastrojo de maíz. Quito, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional.

Quintero, J. C. (2011). Revisión: Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*.

Rendón, M. G. (2013). Determinación de residuos de carbamatos mediante LC-ESI-MS/MS en tomate riñón (*Lycopersicum esculentum*) expendidos en mercados de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Requena, M. (2009). Estudio andaluz de prevalencia de diversas patologías en áreas con distinto nivel de utilización de plaguicidas. Granada, España: Universidad de Granada.

Saldías, D. (7 de Enero de 2012). *Slideshare*. Obtenido de Phylum Basidiomycota: <http://es.slideshare.net/dapollo/filo-basidiomiceto>

Sánchez, J., Orozco, G., Hernández, D., Nieto, M., & Márquez, F. (2006). El sustrato degradado por *Pleurotus pulmonarius* para la degradación del insecticida endosulfán. *Secretariat of the Stockholm Convention Clearing House*, 199-207. Obtenido de http://chm.pops.int/Portals/0/docs/Responses_on_Annex_E_information_for_

endosulfan/Mexico_081229_OGE6734L%20-%20UMFAAC_INGIND_ANEXO_2.pdf.

Sánchez, M. J., & Sánchez Camazano, M. (1984). *Los plaguicidas: Adsorción y Evolución en el suelo*. Obtenido de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>

Santana, D. Z. (Abril de 2013). Factores de exposición e intoxicación por inhibidores de la colinesterasa amitidos en el área clínica del HPDA durante el periodo de Noviembre 2011- Julio 2012. Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato .

Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Sringer*, 787-799. doi:10.1007/s00253-010-2632-1

Serpa, M. J. (2015). Eficiencia de crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai para la producción de biofungicida, aprovechando el residuo agroindustrial de cáscara de haba (*Vicia faba L.*). Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Sieria, M. (2013). *Optimización y escalado de la producción de enzimas quitinolíticas Halobacterium salinarum*. Vigo: Universidad de Vigo.

Singh, D. P., & Dwivedi, S. K. (2005). *Environmental Microbiology and Biotechnology, Degradation of Xenobiotics and Bioremediation*. New Age International (p) Limited, Publishers.

Singh, S. P., Singh, D. K., Singh, H. B., & Rakshit, A. (2014). *Trichoderma*-mediated enhancement of nutrient uptake and reduction in incidence of Rhizoctonia

solani in tomato. *Egyptian Journal of Biology*, 29-38.
doi:<http://dx.doi.org/10.4314/ejb.v16i1.4> AJOL African Journals Online

Soissa, H., Maige, W., Molinos, S., & Aguayo, F. (2005). *Plaguicidas y su clasificación*. Obtenido de Sigweb: <http://www.sigweb.cl/biblioteca/ManualPlagicidas.pdf>

Stamatiu, K. (Diciembre de 2013). Tolerancia y Biodegradación de plaguicidas con hongos filamentosos. Montecillo, Texcoco, México: Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.

Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. (1992). *Microbiología*. Reverté.

Suárez, C. (2010). Obtención *in vitro* de micelios de hongos comestibles, Shitake (*Lentinula edodes*) y Orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Teran, A. (12 de Febrero de 1998). Determinación de plaguicidas carbámicos y sus productos de degradación en el medio ambiente. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.

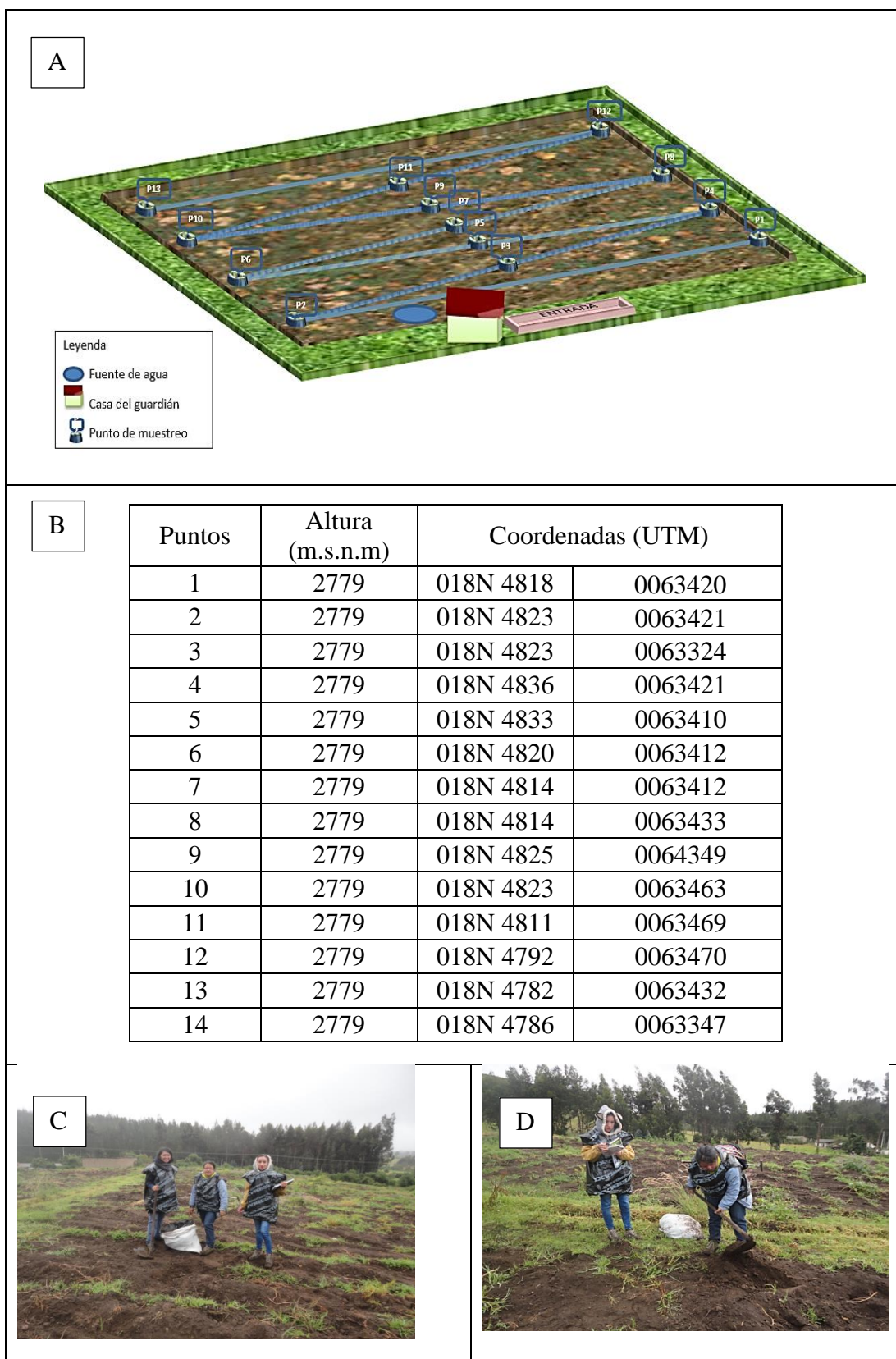
Torres, C., Bernal, B., Rosa, R., & Vázquez-Duhalt, R. (2001). DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS POR EL SISTEMA LACASA-MEDIADOR DE *Coriolopsis gallica*. DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS POR EL SISTEMA LACASA-MEDIADOR DE *Coriolopsis gallica*. México: Instituto de Biotecnología-UNAM.

- Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Punnett, S., Dwivedi, S., Thakur, R., & Deo, R. (2013). *Trichoderma*: a potencial bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 541-550.
- Universidad Nacional Autónoma de México. (9 de Diciembre de 2016). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Obtenido de Glosario de Microbiología y Parsitología:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html#letrac>
- Valderrama, J., Baena, J. A., & Pérez, F. J. (2012). Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad. *Revista Gestion y Ambiente*, 27-38.
- Valencia, Y., Potosí, S., Valencia, E., & Bravo, I. (2010). Validación de una metodología para la determinación de carbofurán en suelos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta (CLAR-UV). *Revista Colombiana*, 359-370.
- Vallejo, M. T. (2014). Caracterización y Clasificación de Trichodermas nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal. *Caracterización y Clasificación de Trichodermas nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanaos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal*. Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- Velasco, J. A., & Sepúlveda, V. (2009). *El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México*. México, D.F.: MX: Instituto Nacional de Ecología.

Villafuerte, P. F. (2011). Factores predisponibles para la intoxicación por fosforados en el hospital general Latacunga; 2010. Riobamba, Ecuador: Escuela superior Politécnica de Chimborazo.

Anexos

Anexo 1: Muestreo del suelo y agua del cultivo de papa.





Nota: A: Mapa con ubicación de puntos de muestreo; B: Puntos de muestreo, obtenidos mediante GPS; C-D: Muestreo del suelo de cultivo de papa; E-F: Muestras de suelo; G-H: Muestreo de agua.

Elaborado por La autora, 2016.

Anexo 2. Muestreo de *P.ostreatus*.



Elaborado por La autora, 2016.

Anexo 3: Montaje del diseño experimental



| G | Inoculación | Fecha | <i>T. harzianum</i> | | <i>P. ostreatus</i> | |
|---|-------------|-----------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | | Número de esporas totales | Conidias/mL | Número de esporas totales | Basidiosporas/mL |
| | 1 | 26-nov-16 | 1535 | 38.4x10 ⁶ | 1366 | 34.2 x10 ⁶ |
| | 2 | 30-nov-16 | 1520 | 38.0x10 ⁶ | 1353 | 33.8 x10 ⁶ |
| | 3 | 04-dic-16 | 1504 | 37.6x10 ⁶ | 1335 | 33.4 x10 ⁶ |
| | 4 | 08-dic-16 | 1500 | 37.5x10 ⁶ | 1300 | 32.5 x10 ⁶ |
| | 5 | 12-dic-16 | 1484 | 37.1 x10 ⁶ | 1344 | 33.6 x10 ⁶ |
| | 6 | 16-dic-16 | 1480 | 37.0 x10 ⁶ | 1330 | 33.3 x10 ⁶ |
| | 7 | 20-dic-16 | 1539 | 38.5 x10 ⁶ | 1378 | 34.5 x10 ⁶ |
| | 8 | 24-dic-16 | 1533 | 38.3 x10 ⁶ | 1340 | 33.5 x10 ⁶ |
| | 9 | 28-dic-16 | 1590 | 39.8 x10 ⁶ | 1339 | 33.5 x10 ⁶ |
| | 10 | 01-ene-16 | 1500 | 37.5 x10 ⁶ | 1333 | 33.3 x10 ⁶ |
| | 11 | 05-ene-16 | 1593 | 39.8 x10 ⁶ | 1326 | 33.2 x10 ⁶ |
| | 12 | 09-ene-16 | 1500 | 37.5 x10 ⁶ | 1304 | 32.6 x10 ⁶ |
| | 13 | 13-ene-16 | 1584 | 39.6 x10 ⁶ | 1388 | 34.7 x10 ⁶ |
| | 14 | 16-ene-16 | 1500 | 37.5 x10 ⁶ | 1344 | 33.6 x10 ⁶ |
| | 15 | 20-ene-16 | 1596 | 39.9 x10 ⁶ | 1390 | 34.8 x10 ⁶ |
| | Promedio | | | 38.3 x10 ⁶ | | 33.6 x10 ⁶ |

Nota: A: Homogenización de la tierra; B-C: Preparación de unidades experimentales; D: Ensayo con tratamientos; E-F: Preparaciones del inóculo micelial; G: Concentraciones de inóculo de cada hongo.

Elaborado por La autora, 2016.

Anexo 4: Metodologías aplicadas

- **Análisis granulométrico**

Una vez seco el suelo, tamizar por una malla de 2mm. Tomar 100g del suelo y colocar en una copa de dispersión, agregar agua destilada hasta llenar unas dos pulgadas por debajo del borde y añadir 5mL de agente dispersante (solución de hexametafosfato y carbonato de sodio al 4%) esta mezcla se deja por 12 h en un vaso de precipitación para que se embeba el suelo. Luego se trasvasa a la copa de dispersión y se coloca al motor de agitación por el lado adecuado y se deja por 10 min. En seguida se vierte el suelo al cilindro cuantitativamente y se complementa con agua hasta la marca inferior, agitar vigorosamente e introducir el hidrómetro si hay espuma se coloca dos gotas de alcohol amílico. De acuerdo a la clasificación de partículas de USDA (United States Department of Agriculture) recomienda hacer dos mediciones en los tiempos de 45seg y 2 h.

Cálculos:

$$\text{Arena total (2 - 0.005mm)} = \frac{\text{Lectura corregida a los 45''} * 100}{\text{g de la muestra seca a los 150}^{\circ}\text{C}}$$

$$\text{Arcilla total (0.002 mm)} = \frac{\text{Lectura corregida a los 2 h} * 100}{\text{g de la muestra seca a los 150}^{\circ}\text{C}}$$

$$\text{Limos (0.05 a 0.002 mm)} = 100 - (\text{arenas}\% + \text{arcillas}\%)$$

Con los datos obtenidos se utiliza el diagrama triangulas USDA.

- **pH del suelo**

Desde un suelo tamizado por una malla de 2mm, pesar 20g de suelo y agregar 50 mL de agua destilada, durante 1h dejar en reposo e ir removiendo con una varilla cada 15 min. Con un potenciómetro calibrado.

- **Conductividad eléctrica**

Del suelo tamizado, pesar 100g en un vaso de precipitación de 1000mL y añadir 500mL de agua destilada, agitar 30min durante un reposo de 2 h. Trasvasar la muestra a un embudo Buchner con filtro y conectarlo a bomba

de vacío para obtener el máximo volumen de solución. Una vez lista la elución, enjuagar la celda de conductividad con abundante agua destilada

- **Materia orgánica**

Desde el suelo tamizado por malla de 0.25mm, pesar 0.1g de suelo con mayor materia orgánica y 0.5g de suelo con menor materia orgánica. Por muestra agregar 5mL de dicromato de potasio 1N y 10mL de ácido sulfúrico al 97%, agitar hasta homogenizar por 1min y reposar por 30min.

Luego agregar 100mL de agua destilada, 5mL de ácido fosfórico al 85% y 10 o 15 gotas de difenilamina. Titular el exceso de dicromato por solución sal de morh de concentración 0.5N; el viraje es de azul a verde.

$$\% \text{Materia orgánica} = \frac{(V_o - V) * N * 0.39 * 1.72 * 1.1}{PM}$$

Donde:

V_o : Volumen inicial en titulación

V : Volumen gastado en titulación

N : Normalidad del sulfato de hierro

0.39: Peso químico equivalente de carbono

1.72: Constante de conversión de C a MO.

1.1: error de conversión de C a MO (10%)

PM : peso de la muestra de suelo

- **Olsen Modificado**

P, K, Ca, Mg, Na, Mn, Cu: En un Erlenmeyer pesar 2.5g de suelo y agregar 25mL de CO_3HNa , agitar mediante un agitador oscilante por 10 min. Luego en un vaso de 100mL filtrar permitiendo que pase la mayor cantidad de la muestra. En un Erlenmeyer colocar 10mL de agua, 2mL de muestra y 8mL de molibdato de amonio-ácido ascórbico y esperar de 20 a 30 min y leer a 660nm en el fotómetro.

Fe, Zn: En un vaso de precipitación pesar 2.5g precisos y agregar 35ml de bicarbonato de sodio, mezclar agitar por 15min a 250rpm. Filtrar y a partir del extracto hacer diluciones para la lectura de absorción atómica.

- Acetato de amonio

En un matraz de 125mL colocar 2.5g de suelo seco y agregar 50mL de Acetato de amonio 1N, proceder agotar por 10 min, después dejar reposar por 15min y filtrar. Del extracto tomar 10mL, agregar 10 mL de agua destilada y 10mL de buffer para calcio –magnesio e incorporar unas gotas de indicado para Ca y Mg. Finalmente incorporar EDTA hasta el viraje de color (rojo a azul).

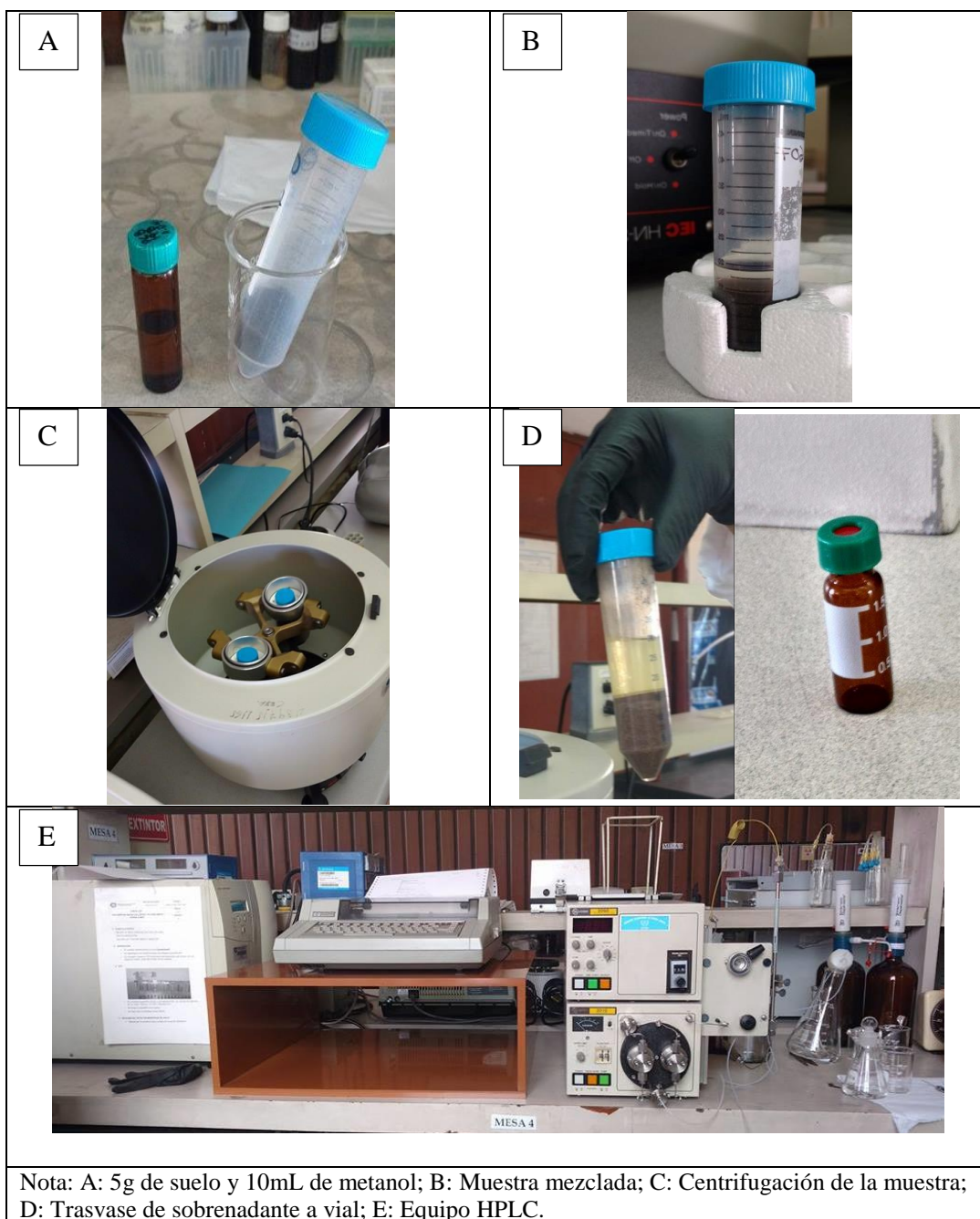
De igual forma se puede obtener las concentraciones de Na, Ca, Mg, K por fotometría de absorción atómica.

S: A partir de la pasta saturada (mezcla de agua suelo), añadir 1mL de ácido clorhídrico 36N y agregar 8mL de agua destilada junto con 0,5 de cloruro de bario. Remover y dejar reposar 30min. Realizar la lectura por fotómetro a 420nm de longitud.

B: A partir del filtrado de suelo, tomar 1mLy agregar 8mL de curcumita, mezclar uniformemente en un vaso de precipitación por 15min. Tomar 2mL de la mezcla y colocar 10mL de etanol o metanol, reposar por 30 min y leer en el fotómetro a una longitud de 555nm.

Fuente: (Laboratorio de suelos y Aguas UPS Cayambe, 2016)

Anexo 5: Análisis químico analítico de suelo.



Elaborado por La autora, 2016.






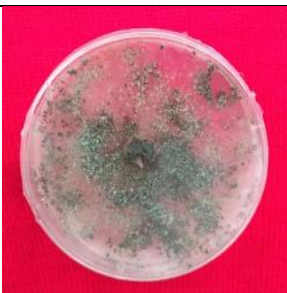
Anexo 6: Elaboración de medios de cultivo

| Reactivos | Procedimiento |
|-------------------------------------|--|
| PDA (Potato Agar Dextrosa) | Para un litro de medio, disolver 39 g del polvo en 1000 mL de agua destilada en un frasco Boeco, mezclar bien y colocar en una plancha de calentamiento por 20 minutos con agitación frecuente. Autoclavar a 121 ° C durante 45 minutos. |
| SDA (Sabouraud Dextrose Agar) | Para un litro de medio, disolver 65 g del polvo en 1000 mL de agua destilada en un frasco Boeco, mezclar bien y colocar en una plancha de calentamiento por 20 minutos con agitación frecuente. Autoclavar a 121 ° C durante 45 minutos. |
| Acido tartárico | Para un 350mL, disolver 6.3 g del polvo en 350mL de agua destilada en un frasco Boeco, mezclar bien y colocar en una plancha de calentamiento por 15 minutos con agitación frecuente. Autoclavar a 121 ° C durante 45 minutos. |
| Gentamicina | Disolver 2mL de cloranfenicol de 16mg en 1L de medio de cultivo y Autoclavar. |
| Cloranfenicol | Para 30mL, disolver 3g del polvo en 30mL de agua destilada en un frasco Boeco, mezclar bien y autoclavar a 121 ° C durante 45 minutos. |

Fuente (Difco, 2012)

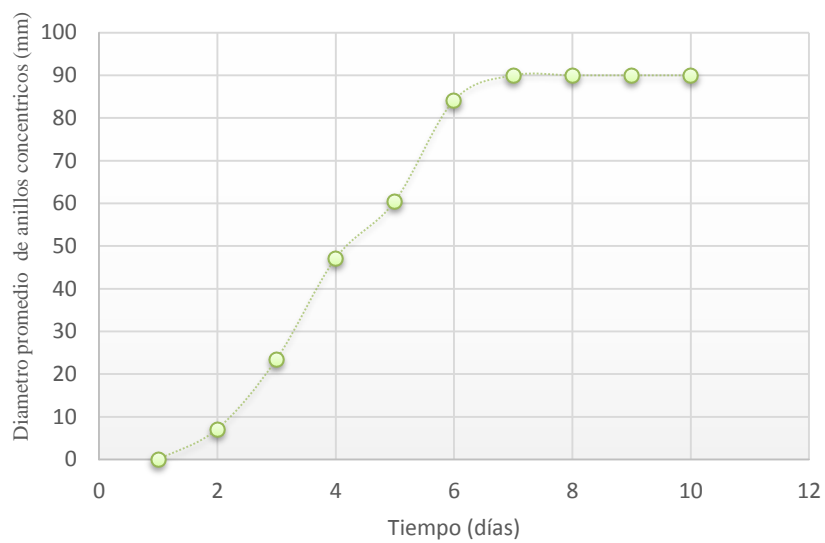
Elaborado por La autora, 2016.

Anexo 7: Aislamiento de *T. harzianum*.

| <p>A</p>  | <p>B</p>  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----------|----|----|----|----|------|----------|----------|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----------|---|---|---|---|---|---|---|----------|---|---|---|---|---|---|-----|----------|----|----|----|----|----|----|------|----------|----|----|----|----|----|----|------|----------|----|----|----|----|----|----|------|----------|----|----|----|----|----|----|------|----------|----|----|----|----|----|----|------|----------|----|----|----|----|----|----|------|----------|----|----|----|----|----|----|------|-----------|----|----|----|----|----|----|------|
| <p>C</p>  | <p>D</p>  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>E</p>  | <p>F</p>  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>G</p> <p style="text-align: center;">Diámetro de crecimiento de <i>T. harzianum</i> a partir de la siembra en días.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="3">Días</th> <th colspan="6">Siembras</th> <th rowspan="3">Promedio</th> </tr> <tr> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> </tr> <tr> <th>mm</th> <th>mm</th> <th>mm</th> <th>mm</th> <th>mm</th> <th>mm</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>6</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>8</td> <td>8</td> <td>8</td> <td>7.2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>23</td> <td>21</td> <td>26</td> <td>25</td> <td>23</td> <td>23</td> <td>23.5</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>48</td> <td>45</td> <td>47</td> <td>48</td> <td>46</td> <td>49</td> <td>47.2</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>61</td> <td>60</td> <td>61</td> <td>62</td> <td>60</td> <td>59</td> <td>60.5</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>83</td> <td>83</td> <td>84</td> <td>88</td> <td>82</td> <td>85</td> <td>84.2</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90.0</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90.0</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90.0</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90</td> <td>90.0</td> </tr> </tbody> </table> | Días | Siembras | | | | | | Promedio | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | mm | mm | mm | mm | mm | mm | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 6 | 7 | 8 | 8 | 8 | 7.2 | 3 | 23 | 21 | 26 | 25 | 23 | 23 | 23.5 | 4 | 48 | 45 | 47 | 48 | 46 | 49 | 47.2 | 5 | 61 | 60 | 61 | 62 | 60 | 59 | 60.5 | 6 | 83 | 83 | 84 | 88 | 82 | 85 | 84.2 | 7 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 | 8 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 | 9 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 | 10 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |
| Días | | Siembras | | | | | | | Promedio | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | mm | mm | mm | mm | mm | mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 6 | 6 | 7 | 8 | 8 | 8 | 7.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 23 | 21 | 26 | 25 | 23 | 23 | 23.5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 48 | 45 | 47 | 48 | 46 | 49 | 47.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 61 | 60 | 61 | 62 | 60 | 59 | 60.5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 83 | 83 | 84 | 88 | 82 | 85 | 84.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

H

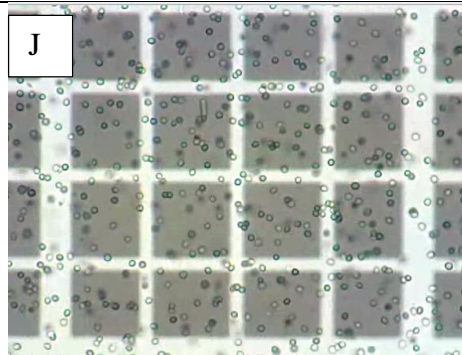
Cinética de *T. harzianum*



I



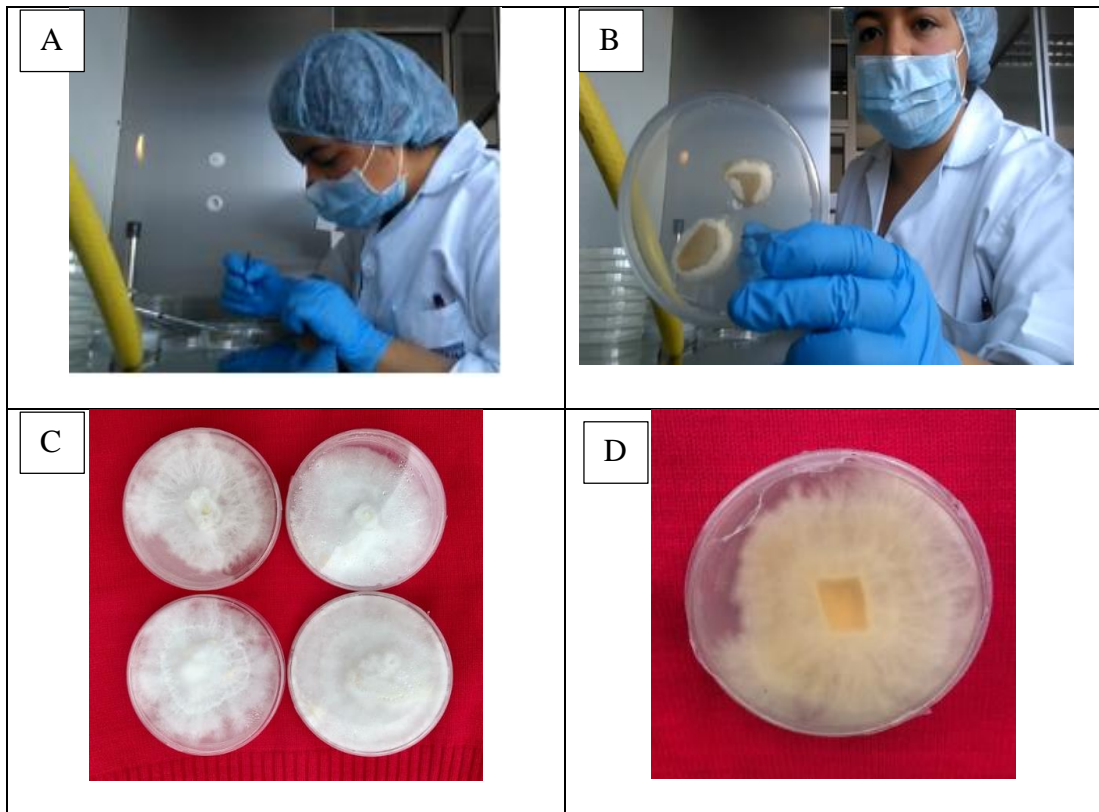
J



Nota: A-B: Preparación de suelo y diluciones; C-D: Siembra e Incubación; E: Microcultivos; F: identificación macroscópica; G-H: Evaluación del crecimiento del micelio (mm) por tiempo (días); I: Identificación microscópica a lente 100X; J: Conteo de conidias/mL.

Elaborado por La autora, 2016.

Anexo 8: Aislamiento de *P.ostreatus*

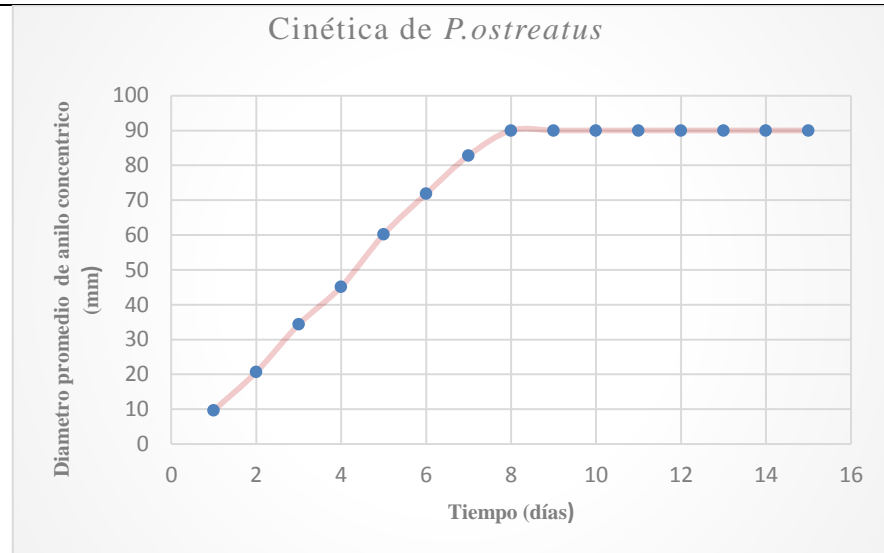


E

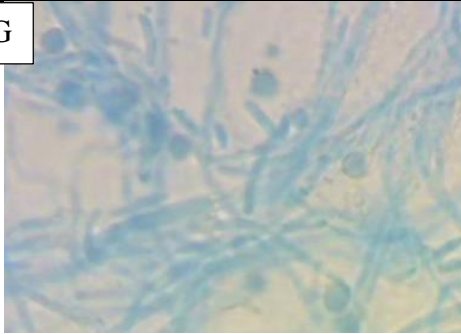
Diámetro de crecimiento de *P.ostreatus* a partir de la siembra en días.

| Días | Siembras | | | | | | Promedio |
|------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| | m m | m m | m m | m m | m m | m m | |
| 1 | 10 | 9 | 10 | 10 | 10 | 9 | 10 |
| 2 | 20 | 22 | 20 | 21 | 21 | 20 | 20.7 |
| 3 | 33 | 34 | 35 | 35 | 35 | 34 | 34.3 |
| 4 | 45 | 45 | 44 | 46 | 46 | 45 | 45.2 |
| 5 | 61 | 60 | 61 | 60 | 60 | 59 | 60.2 |
| 6 | 73 | 71 | 74 | 70 | 70 | 73 | 71.8 |
| 7 | 82 | 84 | 82 | 84 | 82 | 83 | 82.8 |
| 8 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |
| 9 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |
| 10 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |
| 11 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |
| 12 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |
| 13 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |
| 14 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |
| 15 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90.0 |

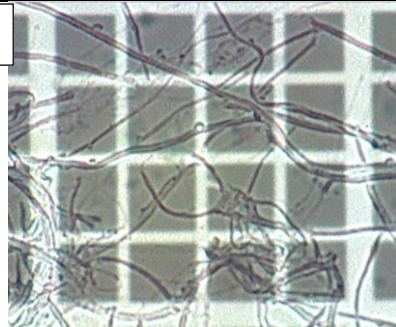
F



G



H



Nota: A: Siembra de laminillas; B-C: Purificación del micelio; D: Identificación macroscópica; E-F: Evaluación del crecimiento del micelio (mm) por tiempo (días); G: Identificación microscópica a lente 100X; H: Conteo de basiosporas/mL.

Elaborado por La autora, 2016.

Anexo 9: Diagnóstico obtenido por PIRI.

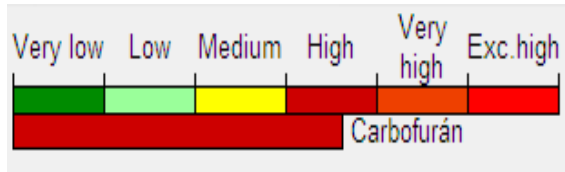
A. Características ambientales de la zona

| | |
|---|------------------------|
| Uso de la fruta | Papa |
| Tipo de suelo | Franco arenoso |
| Mes de inicio para el periodo de interés (incluido) | Abril |
| Mes de finalización para el periodo de interés (incluido) | Mayo |
| Cobertura | Descubierta |
| Media de la pérdida estimada de suelo (Tn/ha) durante el periodo de interés | Erosión |
| 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 |
| pH del suelo | 5.8 |
| Media de la temperatura mínima del aire durante el periodo de interés (°C) | 8 |
| Media de la temperatura máxima del aire durante el periodo de interés (°C) | 22 |
| Diámetro del cuerpo de agua más cercano (m) | 3 |
| Profundidad del cuerpo de agua (m) | 3 |
| Distancia desde el borde del cultivo al cuerpo del agua (m) | 13 |
| Pendiente del terreno al cuerpo del agua (%) | 18 |
| Ancho de la zona buffer o amortiguadora (m) | 2 |
| Número mínimo de días a partir de la aplicación del pesticida y la primera lluvia /irrigación | 1 |
| Insumo agrícola | Carbofurán/insecticida |
| Rango de aplicación del producto es 100%. | 2.5L/ha |
| Fración del ingrediente activo | 0.480 |
| Frecuencia de uso (tiempo/periodo de interés) | 1 |
| Porcentaje de aplicación (%) | 100 |

Elaborado por La autora, 2016.

- Aguas superficiales

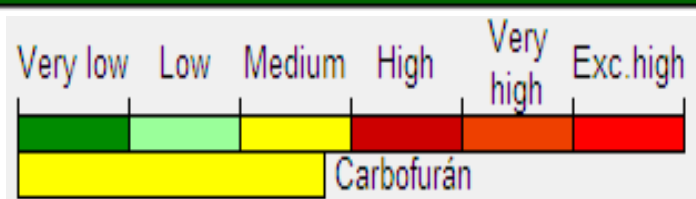
Surface Water, mobility impact comparison:



| Pesticide Information | |
|---|--------------|
| Pesticide | Carbofurán |
| Product application rate (kg or L/ha) | 2.50000 |
| Fraction active ingredient | 0.98000 |
| Frequency of use (times/period of interest) | 1.00000 |
| Percent area treated | 100.00000 |
| Persistence in environment (days) | 120.00000 |
| Koc (litres/kg) | 22.00000 |
| Dissociation | 0.00000e+000 |
| Classification | Insecticida |
| Spray type (mg/l) | 320.00000 |
| Applied load | 2.45000 |
| Kd | 0.31977 |
| Adjusted Persistence in environment (days) | 309.60000 |
| LD50, Mammals (mg/kg) | 7.00000 |
| Sheet erosion | 4.33450e-005 |
| Days application of pesticide to monitoring | 1.00000 |
| Breakdown in soil | 0.96641 |
| SW Runoff (mm) | 1.49108 |
| Fraction runoff | 0.06638 |
| Fraction drift, far side of water body | 1.98863e-005 |
| Fraction drift on surface of water body | 8.19754e-006 |
| SW PP*100, Mobility | 1.62748 |
| SW rating, Mobility | High |

Fuente: (PIRI CSIRO, 2016).

TOTAL LOAD = Very; Surface Water, toxicity impact comparison: LD50, Mammals (mg/kg)

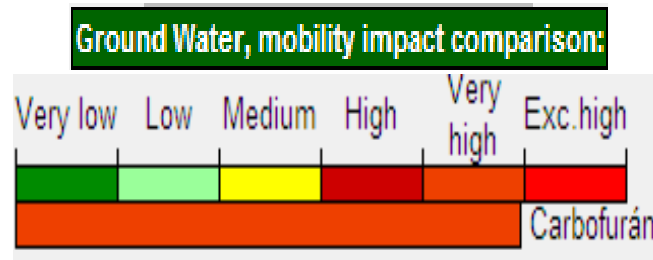


Pesticide Information

| | |
|---|--------------|
| Pesticide | Carbofurán |
| Product application rate (kg or L/ha) | 2.50000 |
| Fraction active ingredient | 0.98000 |
| Frequency of use (times/period of interest) | 1.00000 |
| Percent area treated | 100.00000 |
| Persistence in environment (days) | 120.00000 |
| Koc (litres/kg) | 22.00000 |
| Dissociation | 0.00000e+000 |
| Classification | Insecticida |
| Spray type (mg/l) | 320.00000 |
| Applied load | 2.45000 |
| Kd | 0.31977 |
| Adjusted Persistence in environment (days) | 309.60000 |
| LD50, Mammals (mg/kg) | 7.00000 |
| Sheet erosion | 4.33450e-005 |
| Days application of pesticide to monitoring | 1.00000 |
| Breakdown in soil | 0.99641 |
| SW Runoff (mm) | 1.49108 |
| Fraction runoff | 0.06638 |
| Fraction drift, far side of water body | 1.98983e-005 |
| Fraction drift on surface of water body | 8.19754e-006 |
| Surface water load | 0.35000 |
| SW Pollution Potential * 100 | 0.23250 |
| SW Rating | Medium |

Fuente: (PIRI CSIRO, 2016).

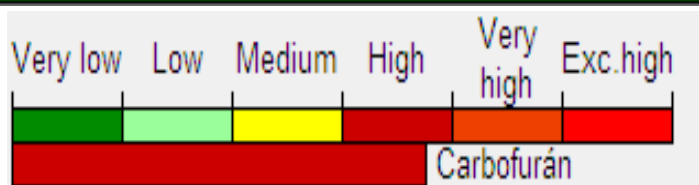
- Aguas subterráneas



| Pesticide Information | |
|---|--------------|
| Pesticide | Carbofurán |
| Product application rate (kg or L/ha) | 2.50000 |
| Fraction active ingredient | 0.98000 |
| Frequency of use (times/period of interest) | 1.00000 |
| Percent area treated | 100.00000 |
| Persistence in environment (days) | 120.00000 |
| Koc (litres/kg) | 22.00000 |
| Dissociation | 0.00000e+000 |
| Classification | Insecticida |
| Spray type (mg/l) | 320.00000 |
| Applied load | 2.45000 |
| Kd | 0.31977 |
| Adjusted Persistence in environment (days) | 309.60000 |
| LD50, Mammals (mg/kg) | 7.00000 |
| GW Pollution Potential (kg/ha), Mobility only | 1.18089 |
| GW Pollution Potential (ppb), Mobility only | 118.08854 |
| GW Rating Mobility only | Very high |

Fuente: (PIRI CSIRO, 2016).

TOTAL LOAD = Exc.high; Ground Water, toxicity impact comparison: LD50, Mammals (mg/kg)



| Pesticide Information | |
|--|--------------|
| Pesticide | Carbofurán |
| Product application rate (kg or L/ha) | 2.50000 |
| Fraction active ingredient | 0.98000 |
| Frequency of use (times/period of interest) | 1.00000 |
| Percent area treated | 100.00000 |
| Persistence in environment (days) | 120.00000 |
| Koc (litres/kg) | 22.00000 |
| Dissociation | 0.00000e+000 |
| Classification | Insecticida |
| Spray type (mg/l) | 320.00000 |
| Applied load | 2.45000 |
| Kd | 0.31977 |
| Adjusted Persistence in environment (days) | 309.60000 |
| LD50, Mammals (mg/kg) | 7.00000 |
| Recharge rate (mm/year) | 86.28441 |
| Fraction of pesticide in soil water | 0.26747 |
| Adjusted Fraction of pesticide in soil water | 0.26747 |
| Mean residence time (days) through the profile depth | 326.94481 |
| Average downward velocity (mm per day) | 0.68819 |
| Attenuation factor | 0.48199 |
| Ground water load | 0.35000 |
| GW Pollution Potential(kg/ha) | 0.16870 |
| GW Pollution Potential(ppb) | 16.86979 |
| GW Rating | High |

Fuente: (PIRI CSIRO, 2016).

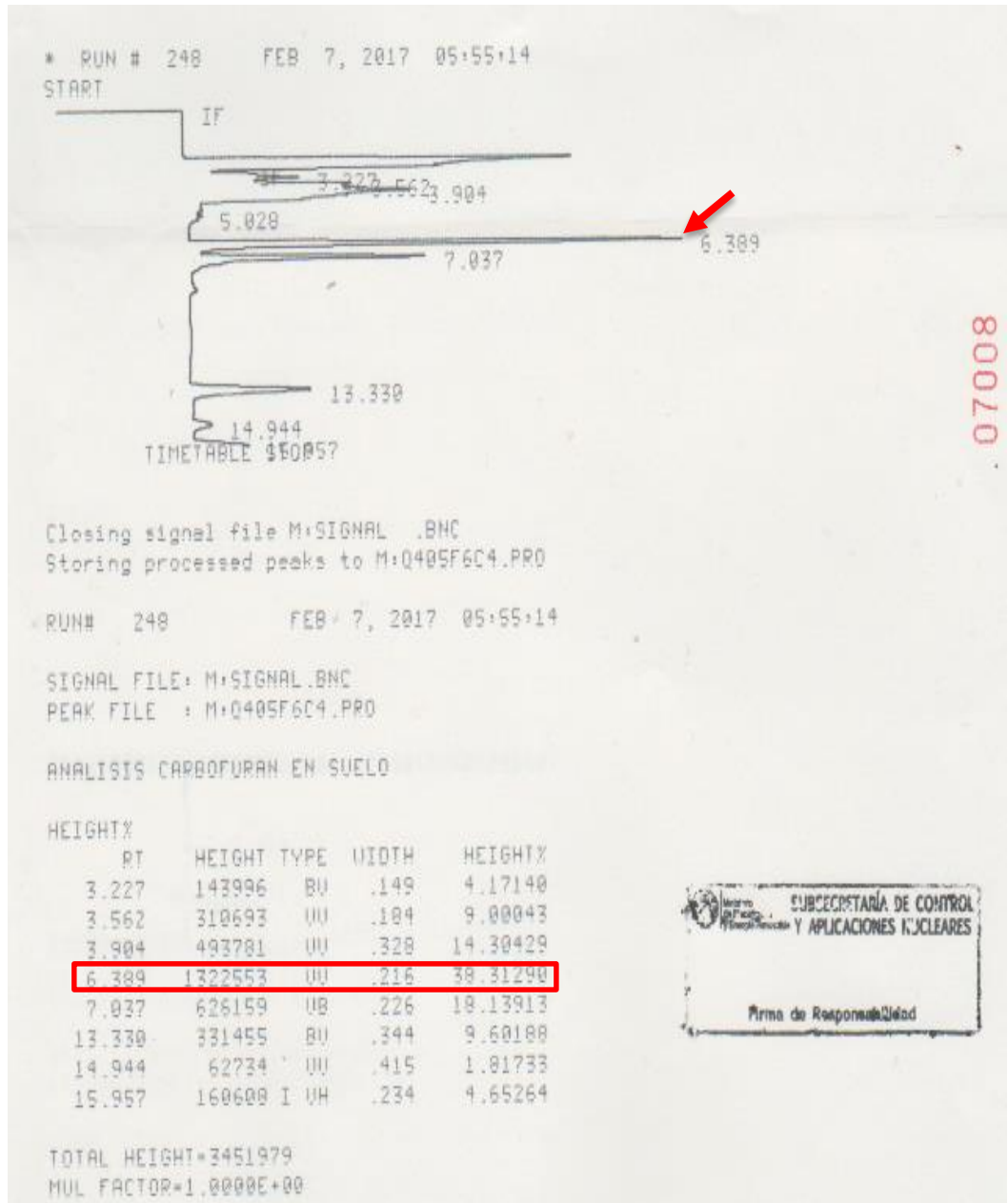
B. Propiedades fisicoquímicos de carbofurán

| Propiedad | Valor |
|---------------------------------|---------|
| Solubilidad | 320mg/L |
| Koc- coeficiente de adsorción | 22mL/g |
| Kd-coeficiente de distribución | 0.3mL/g |
| GUS- Groundwater Ubiquity Score | 5.5 |

Elaborado por Paredes, 2016.

Anexo 10: Resultados

A. Cromatograma de suelo inicial



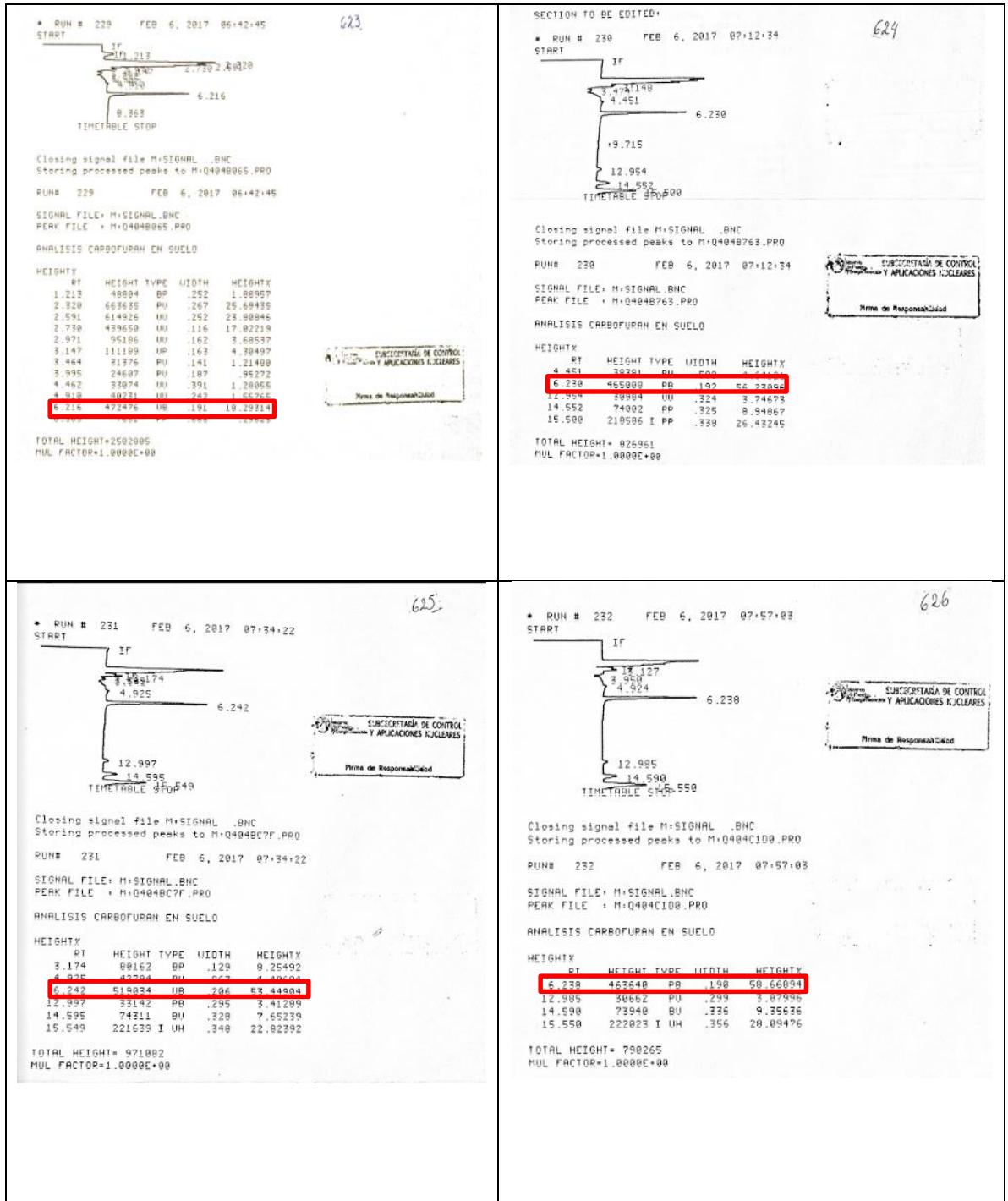
Fuente: (Laboratorio de Comisión de Energía Atómica, 2016).

B. Tabla de datos obtenidos en cada muestra: Altura y tiempo de retención de las muestras de suelo iniciales y finales

| | Código de muestras | Peso en seco (g) | Altura del pico (mm) | Tiempo de retención (min) | Concentración de carbofurán (µg /g) | Diferencia de concentraciones (µg /g) |
|---------------|--------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Suelo inicial | 549 | 5.5 | 1322553 | 6.3 | 6632 | - |
| ToR1 | 619 | 5.0 | 611578 | 6.3 | 3375 | 3257 |
| ToR2 | 620 | 5.0 | 568004 | 6.4 | 3157 | 3475 |
| ToR3 | 621 | 5.0 | 590194 | 6.5 | 3280 | 3352 |
| ToR4 | 622 | 5.0 | 577453 | 6.5 | 3189 | 3443 |
| T1R1 | 623 | 5.3 | 472476 | 6.2 | 2459 | 4173 |
| T1R2 | 624 | 5.4 | 465008 | 6.2 | 2371 | 4261 |
| T1R3 | 625 | 5.5 | 519034 | 6.2 | 2591 | 4041 |
| T1R4 | 626 | 5.3 | 463640 | 6.2 | 2425 | 4207 |
| T2R1 | 627 | 4.8 | 513290 | 6.5 | 2977 | 3655 |
| T2R2 | 628 | 5.0 | 487733 | 6.3 | 2706 | 3926 |
| T2R3 | 629 | 4.9 | 510180 | 6.6 | 2863 | 3769 |
| T2R4 | 630 | 4.9 | 531557 | 6.5 | 2967 | 3665 |
| T3R1 | 631 | 4.9 | 486858 | 6.6 | 2766 | 3866 |
| T3R2 | 632 | 5.0 | 443277 | 6.5 | 2461 | 4171 |
| T3R3 | 633 | 4.5 | 448963 | 6.4 | 2752 | 3880 |
| T3R4 | 634 | 4.7 | 386869 | 6.4 | 2279 | 4353 |

Nota: Datos obtenidos del análisis químico analítico para cada muestra desde el peso inicial que se tomó, la altura del pico obtenido y el tiempo de retención con el que se identifica este insecticida. En base a los mismos se obtiene la concentración en µg /g.
Fuente: (Laboratorio de Comisión de Energía Atómica, 2016).
Elaborado por La autora, 2016.


C. Picos del tratamiento que mayor degradación presentó



Fuente: (Laboratorio de Comisión de Energía Atómica, 2016).

Elaborado por La autora, 2016.

D. Análisis de muestra de agua

| | | |
|---|---|---------------------|
|  <p>Ministerio de Electricidad y Energía Renovable</p> | <p>LABORATORIO DEL MINISTERIO DE ELECTRICIDAD Y ENERGÍA RENOVABLE</p> <p>ANÁLISIS QUÍMICO CONVENCIONAL</p> | <p>LMEER</p> |
|---|---|---------------------|

REPORTE DE ANALISIS

Factura N° 3484

| | |
|---|---|
| Solicitante: | Universidad Politécnica Salesiana |
| Dirección solicitante: | Av. Isabel La Católica N 23-52 y Madrid |
| Muestras de: | Suelos y Agua |
| Muestreado por: | Universidad Politécnica Salesiana |
| Número de muestras: | Cuatro |
| Fecha de ingreso al laboratorio: | 20 - Junio - 2016 |
| Fecha de procesamiento de muestra: | 20-junio - 2016 |
| Fecha de análisis instrumental: | 24 - Junio - 2016 |
| Fecha de emisión de reporte: | 16 - Septiembre - 2016 |

RESULTADOS DE ANALISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN AGUA Y SUELO

| Plaguicidas/Código de muestras | AGUA* | Suelo 1* | Suelo 1B* | Suelo 1C* |
|--------------------------------|-------|----------|-----------|-----------|
| Carbofuran | <LC | < LC | <LC | <LC |
| Chlorpirifos | < LC | 0.084 | 0.079 | 0.088 |
| Trifluralin | < LD | 0.049 | < LC | < LC |
| Phenamifos | < LD | 0.914 | < LC | < LC |
| Profenophos | < LD | 0.075 | 0.080 | 0.078 |
| Propiconazole | < LD | 0.067 | 0.060 | 0.068 |
| Bifenthrin | < LC | 0.085 | 0.084 | < LC |
| Endosulfan alfa | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Endosulfan Beta | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Cyhalothrin | < LD | 0.055 | 0.052 | 0.055 |
| Azoxistrobin | < LD | 0.332 | 0.252 | 0.340 |

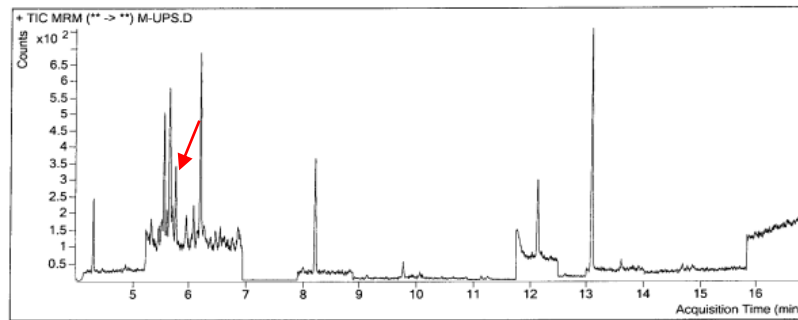
*: Concentración en microgramos de plaguicida por gramo de muestra (µg/g)
 <LD: Menor que el Límite de detección
 <LC: Menor que el Límite de Cuantificación

| | |
|--|------------|
| <p>Dirección: Juan Lema N15-38 y Ríofrio, 6to. Piso. QUITO – ECUADOR TEL: 2 545 881 / 2 545 649 ☎ Correo electrónico: cesar.castro@meer.gob.ec</p> | <p>1/2</p> |
|--|------------|

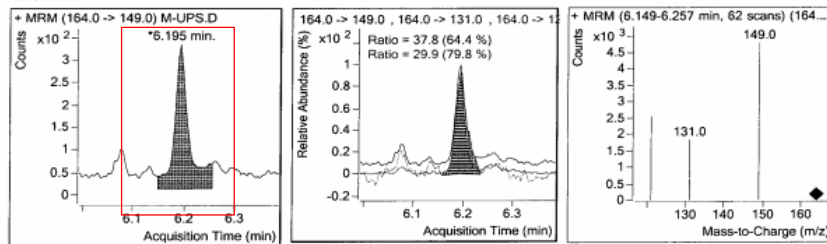
Fuente: (Laboratorio de Comisión de Energía Atómica, 2016).

Quantitative Analysis Report for EPA

Data File : M-UPS.D
Operator : MEER-ECOTOX-HP\MEER-ECOTOX
Acq Method Name : MRM 2016-04-20
Acquisition date : 2016-05-18 14:36
Sample Name : M-UPS
Vial : 5
Sample Info : UPS, Analisis Agua plaguicidas, 1 litro con DCM + PCB 198 (7.50 ul de 1 ng/ul). Analisis GC/MS/MS.
Quant Method :
Tune File : atunes.eiex.tune.xml
Tune Date : 2015-11-10T08:29:42.936-05:00
Quant Batch Name : CC-ABRIL2016.batch.bin
Last Calib Update : 2016-08-29 10:33




Carbofuran



Fuente: (Laboratorio de Comisión de Energía Atómica, 2016).

E. Análisis de pesticidas en papa



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cia. Ltda.


ÁREA QUÍMICA

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

| | |
|---|---|
| <p>Cliente: LAURA ELIZABETH HUACH ESPIN Representante: Laura Huach Dirección: La Kened Teléfono: 2401712 FAX: Identificación de la Muestra: PAPA Descripción de la Muestra: Papa cruda con cáscara Contenido declarado: 500 g No. Lote o código: ND Fecha de elaboración: ND FAX: Fecha de caducidad: ND Conservación de la Muestra: Ambiente Muestras: Por el cliente</p> | <p>Fecha de toma de muestra: ND Fecha de recepción: 24 ene-2017 Fecha de ensayo: 24 ene-07 feb-2017 Fecha de reporte: 7 Ago-2017</p> |
|---|---|

Resultados analíticos: Pag: 2 de 2

| PARAMETRO | METODO | UNIDAD | RESULTADO |
|------------|---------------|--------|-----------|
| Carbamatos | 65010 HPLC | mg/KG | 0.54 |



Q.F. Andres Cumba A.
CENTROCESAL CIA. Ltda.
Andres Cumba
RESPONSABLE DE ANÁLISIS



Dr. Carlos López M.
Directo de Calidad
CENTROCESAL CIA. Ltda.
Carlos Lopez
RESPONSABLE DE SUPERVISIÓN

Nota: ND: No detecta; NA: No aplica.
 NOTA 1: Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este informe.
 NOTA 2: Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.
 NOTA 3: Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL CIA. LTDA. son respaldadas únicamente de los análisis.
 NOTA 4: La detección sobre la identificación de residuos, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecta a las normas de una especificación.
 NOTA 5: Las opiniones/interpretaciones/leer., que se puedan indicar, están FUERA del alcance de acreditación del SAC.
 NOTA 6: El tiempo de procesamiento de las muestras en el laboratorio, corresponde a promedio: 48 horas y no percibidas 30 días contados desde que se entrega el resultado.

ISO 9001:2015 y ISO 17025:2005

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

Av. Amazonas 1011-022 y Av. Bolívar de Jirón
 Telf: (0051) 011 220040 - 220070
 Fax: Ext. 100 - Celular: 999490071
 e-mail: info@centrocesal.com
 info@centrocesal.com
 QUITO - ECUADOR

F. Análisis físico químico del suelo

- Inicial




LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cliente: UPS. GRUPO DE INVESTIGACIÓN NUNKUY WAKAN

Dirección: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson **Tel./Cel:** 3962800 ext. 2658

Contacto: Ing Agr. Laura Elizabeth Huachi Espín **E-mail:** lhuachi@ups.edu.ec

Cantidad de muestras: 1 **Tipo de Cultivo:** ...

Fecha de Ingreso: 16/05/2016 **Fecha Emisión:** 24/05/2016

Nº de Informe: 16274 **Total de pag.:** 1

Identificación de Usuario: MUESTRA 1B **Código de Laboratorio:** LS416-331

INFORME DE RESULTADOS

| pH | C.E. | M.O. | N-Total | P | K | Cu | Mg | Na | S |
|--------|---------|--------|---------|----------|---------|----------|---------|---------|--------|
| ad. | ml/cm | % | % | ppm | mg/100g | mg/100g | mg/100g | mg/100g | ppm |
| 5,80 B | 1,33 OK | 2,50 B | 0,13 B | 25,70 OK | 1,38 OK | 12,17 OK | 3,98 OK | 0,17 OK | 6,20 B |

| B | Fe | Mn | Cu | Zn | RELACIONES | | | CICE |
|---------|----------|----------|---------|---------|------------|---------|---------|---------|
| mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | Fe/Mn | Cu/Mg | Mg/S | mg/100g |
| 1,15 OK | 78,84 OK | 15,25 OK | 4,80 OK | 246,5 A | 5,83 A | 3,08 OK | 2,93 OK | 75,78 A |

Origen del criterio de valoración:
Estación Experimental Pichilingue-INIAP, 2012

Método de análisis:
P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn - *Atomilab:* Olsen Modificado
Ca, Mg, K, Na - *Atomilab:* Acetato de Amonio
Conductividad Eléctrica: pH 1-1,25 H₂O
Peso Sólido: Conductividad Eléctrica, S, R
Materia Orgánica: 1-0,5 K₂C₂O₇ 0,8 N

Sintaxis:
A: alta; B: bajo; OK: adecuado
mg/L: miligramos por litro; mg/100g: miligramos por cien gramos
ml/cm: mililitros; %: porcentaje

Nota Adicional: Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.

TEXTURA (%)

| ARMA | LESA | ARCILA |
|------|------|--------|
| 76 | 16 | 8 |

FRANCO-ALBURO



Ing. Agr. Orlando Obaltema
Técnico de Suelos y Agua



Ing. Agr. María Santibañez
Responsable de Laboratorio


Página 1: copia 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA


Cayambe, Av. Natalia Jarrín N395 y 9 de Octubre, Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504
Correo electrónico: oguslavis@ups.edu.ec / bioagroib@ups.edu.ec

Fuente: (Laboratorio de suelos y Aguas UPS Cayambe, 2016)

○ Final



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA**
ECUADOR



**SALESIANAS
CON VOCACIÓN**

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cliente: *Laura Elizabeth Huachi Egite*
Dirección: Nicolás Viscozón N 5725 y Borrero - Quito
Contacto: Ing. Agr. Jairo Bolívar
Cantidad de muestras: 1
Fecha de Ingreso: 07/02/2017
N° de Informe: 17054
Identificación de Usuario: I C

Tel./Cel: 3962900
E-mail: huachi@ups.edu.ec
Tipo de Cultivo: Sin identificación
Fecha Emisión: 14/02/2017
Total de pag.: 1
Código de Laboratorio: SA17-100

INFORME DE RESULTADOS


| pH | C.E. | M.O. | N (NH4) | P | K | Ca | Mg | Na | S |
|--------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|----------|
| unif | mS/cm | % | % | mg/L | mg/100g | mg/100g | mg/100g | mg/100g | mg/L |
| 6,16 B | 3,49 A | 7,18 A | 0,25 A | 0,01 B | 4,35 A | 6,16 OK | 3,42 OK | 0,27 OK | 408,65 A |

| B | Fe | Mn | Cu | Zn | RELACIONES | | | | Som. Base mg/100g |
|--------|----------|---------|---------|--------|------------|--------|--------|---------|----------------------|
| | | | | | Fe/Si | Ca/Mg | Mg/K | Ca+Mg/K | |
| 0,31 B | 241,70 A | 74,84 A | 16,28 A | 2,81 B | 4,57 B | 1,82 B | 0,79 B | 5,17 B | 14,59 OK |


Origen del criterio de valoración:
 Entidad Experimental Pichincha-INIAF, 2012
 Método de extracción:
 P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn - Asimilables: Óxido Modificado;
 Ca, Mg, K, Na - Intercambiables: Acetato de Sodio-Citrato;
 Conductividad Eléctrica-pH 1-1,25 (M2);
 Punto Saturado: Conductividad Eléctrica, S, B;
 Materia Orgánica: 0.1-0.5 K2Cr2O7 0.8 N; NDA-N: Test de Nitrato Merck

Simbología
 A: alto; B: bajo; OK: adecuado
 mg/L: miligramos por litro; mg/100g: miligramos por cien gramos
 unif: unidades; %: porcentaje
 ... parámetro no valorado


Nota Adicional: Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.



Ing. Agr. Orlando Gualever
Técnico de Suelos y Agua



Quen De Alim. Paola Sotelo
Responsable de Laboratorio



Laboratorio de Suelos y Agua

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA
 Cayambe, Av. Natalia Jamín N395 y 9 de Octubre. Teléfonos: (593) 2 3962 946 / 3962 800 ext. 2504
 Correo electrónico: ogualavis@ups.edu.ec / bioagrolib@ups.edu.ec

Fuente: (Laboratorio de suelos y Aguas UPS Cayambe, 2016)

G. Valores iniciales y finales del análisis fisicoquímico.

| Parámetro | pH | C.E. | M.O. | N-Total | P | K | Ca | Mg | Na | S |
|---------------|------|-------|------|---------|-------|----------|----------|------|----------|--------|
| Unidades | uds | mS/cm | % | % | ppm | meq/100g | meq/100g | meq/ | meq/100g | ppm |
| Valor inicial | 5.80 | 1.33 | 2.50 | 0.13 | 25.70 | 1.36 | 12.17 | 3.98 | 0.17 | 6.20 |
| Valor final | 6.10 | 3.49 | 7.08 | 0.35 | 0.01 | 4.35 | 6.56 | 3.42 | 0.27 | 408.66 |

| Parámetro | B | Fe | Mn | Cu | Zn | Relaciones | | | | CICE |
|---------------|------|-------|-------|-------|-------|------------|-------|------|-----------|----------|
| Unidades | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L | Fe/Mn | Ca/Mg | Mg/K | Ca + Mg/K | meq/100g |
| Valor inicial | 1.15 | 76.64 | 15.23 | 4.40 | 246.5 | 5.03 | 3.06 | 2.93 | 35.70 | 17.68 |
| Valor final | 0.01 | 341.7 | 74.84 | 16.28 | 2.81 | 4.57 | 1.92 | 0.79 | 5.15 | 14.59 |

Nota: A: alto; B: bajo; OK: adecuado

Fuente: (Laboratorio de suelos y Aguas UPS Cayambe, 2016)

Elaborado por La autora, 2016.

H. Variables medidas y analizadas por Infostat.

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|-----------------|----|----------------|-------------------|------|
| Concentraciones | 16 | 0,85 | 0,81 | 3,91 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|------------|----|-----------|-------|---------|
| Modelo. | 1513492,25 | 3 | 504497,42 | 22,36 | <0,0001 |
| TRATAMIENTOS | 1513492,25 | 3 | 504497,42 | 22,36 | <0,0001 |
| Error | 270705,50 | 12 | 22558,79 | | |
| Total | 1784197,75 | 15 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=315,31066

Error: 22558,7917 gl: 12

| TRATAMIENTOS | Medias | n | E.E. |
|--------------|---------|---|-----------|
| 1 | 4170,50 | 4 | 75,10 A |
| 3 | 4067,50 | 4 | 75,10 A B |
| 2 | 3753,75 | 4 | 75,10 B |
| 0 | 3381,75 | 4 | 75,10 C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------|----|----------------|-------------------|------|
| TEMPERATURAS | 16 | 0,22 | 0,02 | 0,39 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|------|----|---------|------|---------|
| Modelo. | 0,01 | 3 | 4,0E-03 | 1,12 | 0,3804 |
| TRATAMIENTOS | 0,01 | 3 | 4,0E-03 | 1,12 | 0,3804 |
| Error | 0,04 | 12 | 3,5E-03 | | |
| Total | 0,05 | 15 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12494

Error: 0,0035 gl: 12

| TRATAMIENTOS | Medias | n | E.E. |
|--------------|--------|---|--------|
| 0 | 15,20 | 4 | 0,03 A |
| 3 | 15,18 | 4 | 0,03 A |
| 1 | 15,18 | 4 | 0,03 A |
| 2 | 15,13 | 4 | 0,03 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|-----------|----|----------------|-------------------|------|
| HUMEDADES | 16 | 0,20 | 0,00 | 1,15 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 2,19 | 3 | 0,73 | 1,00 | 0,4262 |
| TRATAMIENTOS | 2,19 | 3 | 0,73 | 1,00 | 0,4262 |
| Error | 8,75 | 12 | 0,73 | | |
| Total | 10,94 | 15 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,79264

Error: 0,7292 gl: 12

| TRATAMIENTOS | Medias | n | E.E. | |
|--------------|--------|---|------|---|
| 2 | 74,50 | 4 | 0,43 | A |
| 1 | 74,00 | 4 | 0,43 | A |
| 3 | 73,75 | 4 | 0,43 | A |
| 0 | 73,50 | 4 | 0,43 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| pHs | 16 | 0,91 | 0,89 | 2,61 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|------|----|------|-------|---------|
| Modelo. | 3,22 | 3 | 1,07 | 41,18 | <0,0001 |
| TRATAMIENTOS | 3,22 | 3 | 1,07 | 41,18 | <0,0001 |
| Error | 0,31 | 12 | 0,03 | | |
| Total | 3,53 | 15 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,33878

Error: 0,0260 gl: 12

| TRATAMIENTOS | Medias | n | E.E. | |
|--------------|--------|---|------|-----|
| 1 | 6,65 | 4 | 0,08 | A |
| 3 | 6,48 | 4 | 0,08 | A B |
| 2 | 6,18 | 4 | 0,08 | B |
| 0 | 5,48 | 4 | 0,08 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Fuente: (Infostat, 2016)

Elaborado por La autora, 2016.