

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA Y METHAMIDOPHOS POR  
*Pseudomonas sp*, *Pseudomonas Putida* y *Pseudomonas Fluorescens* EN  
CONDICIONES DE LABORATORIO.**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. Eustaquio Cruz, Noemi**

**Bach. Espinoza Ponte, Yeraldy Nathaly**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGÍA**

**NUEVO CHIMBOTE - PERÚ**

**2021**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA Y METHAMIDOPHOS POR**  
*Pseudomonas sp., Pseudomonas Putida y Pseudomonas Fluorescens* **EN**  
**CONDICIONES DE LABORATORIO.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN**  
**BIOTECNOLOGÍA**

**TESISTAS**

Bach. Eustaquio Cruz, Noemi

Bach. Espinoza Ponte, Yeraldy Nathaly

**Revisado y aprobado por el asesor**

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Carlos Azañero', is written over a horizontal line.

Dr. Carlos Azañero Díaz

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA Y METHAMIDOPHOS POR**  
*Pseudomonas sp., Pseudomonas Putida y Pseudomonas Fluorescens* **EN**  
**CONDICIONES DE LABORATORIO.**

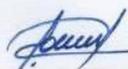
**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN**  
**BIOTECNOLOGÍA**

**TESISTAS**

Bach. Eustaquio Cruz, Noemi

Bach. Espinoza Ponte, Yeraldy Nathaly

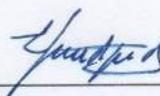
**Revisado y aprobado por el jurado evaluador**



M. Sc. José Villanueva Carlos  
Presidente



M. Sc. Eterio Alva Muñoz  
Secretario



Dr. Carlos Azañero Díaz  
Integrante

## **Dedicatoria**

Este presente informe de tesis lo dedicamos en primer lugar a Dios que nos brinda protección, sabiduría y fortaleza para seguir cumpliendo nuestras metas trazadas, a nuestros padres Clementina y Joaquín; y Andrez y Eusebia por todo el apoyo, amor y por ser los verdaderos protagonistas de nuestros logros, a nuestro asesor Carlos que fue guía en nuestro desarrollo de tesis y etapa universitaria, a nuestras hermanas Magdalena, Isela, Katherine y Marjorie toda la ayuda y alegría que nos brindan.

A nuestra familia de amigos y mentores por su apoyo incondicional, paciencia y confianza porque sin ello hubiese sido mucho más difícil de alcanzar nuestras metas y objetivos.

## **Agradecimiento**

Este informe de tesis desarrollado en la Universidad del Santa de Chimbote es un trabajo de alto valor, donde participaron distintas personas aportando, revisando, con la paciencia debida, alentándonos, conduciéndonos en las etapas con alta dificultad y en las etapas asertivas. Trabajo que nos ha abierto un camino en la ciencia lleno de expectativas prometedoras en el en base a la experiencia de personas resaltantes, motivo por el cuál agradecemos a continuación.

Dios todopoderoso por fortalecernos y guiarnos a lo largo de nuestra vida en especial en nuestra etapa universitaria siendo un pilar en momentos difíciles, sin él podríamos haber truncado nuestros sueños y metas.

Agradecer especialmente a nuestros padres: Joaquin y Clementina; Andrez y Eusebia por ser la razón principal de querer lograr nuestros objetivos de superación, por confiar en desarrollo intelectual, por los consejos, valores y principios inculcados. El apoyo que nos brindaron permitió que este logro sea exitoso sin ellos hubiese sido más dificultoso.

Agradecemos a los docentes de la Escuela de Biotecnología, por habernos transmitido sus conocimientos y experiencia en la formación y desarrollo de nuestra profesión, a la vez un agradecimiento especial al master Carlos Azañero Díaz asesor de nuestro proyecto de investigación quien nos ha orientado permanentemente.

A nuestros compañeros de estudio y amigos presentes, y cada una de las personas que forman parte del laboratorio, por el gran grupo humano y buenas palabras, que con ellos hemos compartidos, aula de clases, laboratorio, horas de estudio y buenos momentos, lo cual no tiene un gran significado para nosotras. Por las conversaciones con base científica de las que hemos aprendido significativamente.

A todos por el respaldo, nuestro mayor agradecimiento.

## INDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>12</b>
<b>I. INTRODUCCION .....</b>	<b>13</b>
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1. Objetivo General .....	15
2.2. Objetivo Específicos .....	15
<b>III. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
3.1. Los plaguicidas.....	16
3.2. Degradación de plaguicidas .....	22
3.3. Rol de las <i>pseudomonas</i> en la degradación de los plaguicidas .....	24
3.4. Antecedentes de los plaguicidas.....	26
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>V. Resultados y discusión.....</b>	<b>30</b>
a. Resultados.....	30
b. Discusiones.....	33
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>39</b>
<b>VIII. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. Anexos .....</b>	<b>48</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 .Lista de Plaguicidas empleados en la actividad agrícola con registro vigente.	17
Tabla 2. Cuadro resumen que muestra los ingredientes activos de los plaguicidas químicos en estudio, datos registrados al 31 Agosto del 2017 ante el SENASA .....	18
Tabla 3 Tasa de incidencias por departamentos .....	18
Tabla 4. En la tabla se detalla las familias de herbicidas que presentan componentes potencialmente persistentes en el ambiente .....	20
Tabla 5. Uso de plaguicidas poblaciones del Valle del Mantaro, Junín. ....	28
Tabla 6.Composición de caldo LB usado para el cultivo de Pseudomonas.....	29
Tabla 7 Análisis de varianza para la 1 Repetición.....	34
Tabla 8 Análisis de varianza para la repetición 2 .....	34
Tabla 9 Análisis de varianza para la época 3 .....	35
Tabla 10 Análisis de varianza para las repeticiones 2 y 3 .....	36
Tabla 11 Comparaciones por parejas de Tukey.....	37
Tabla 12 Calibración de Mathamidophos.....	55
Tabla 13 Calibración de Atrazina .....	56
Tabla 14 Diseño del sistema matriz.....	59

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Tipo de plaguicidas utilizados en la exposición al plaguicida Perú 2019 .....	19
Figura 2 Molécula de Atrazina (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub> ). .....	20
Figura 3. Formula de Methamidophos (C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub> PS). .....	21
Figura 4 Degradación de Atrazina por <i>Pseudomonas sp</i> .....	31
Figura 5 Degradación de Methamidophos por <i>Pseudomonas sp</i> .....	31
Figura 6 Degradación de Atrazina por <i>Pseudomonas putida</i> .....	31
Figura 7 Degradación de Methamidophos por <i>Pseudomonas putida</i> .....	32
Figura 8 Degradación de Atrazina por <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	33
Figura 9 Degradación de Methamidophos por <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	33
Figura 10 Diagrama de metodología de estudio .....	48
Figura 11 Mantenimiento, cultivo continuo de las cepas <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	49
Figura 12. Crecimiento de <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en agar nutritivo.....	49
Figura 13. Obtención de inóculo concentrado de <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en solución salina para las diluciones.....	50
Figura 14. Escala de McFarland referencia para las suspensiones de <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en solución salina fisiológica	50
Figura 15. Inoculación 1ml de <i>Pseudomonas sp</i> a una concentración bacteriana de 3x10 <sup>8</sup> bacterias/mL, a los matraces respectivos .....	51
Figura 16. Sistema de biodegradación del plaguicida atracina por las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en cada matraz, en la figura se muestra en el tiempo 0 (inicio del sistema) y transcurrido 15 días (fin del sistema) de biodegradación. ....	51
Figura 17. Sistema de biodegradación del plaguicida methamidophos por las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en cada matraz, en la figura se muestra en el tiempo 0 (inicio del sistema) y transcurrido 15 días (fin del sistema) de biodegradación. ....	52
Figura 18. Muestreo: A) Toma de muestra del sistema (Plaguicida+ inóculo+ caldo LB) B) Deposito de la muestra a ser evaluada en tubos. C) Tubo conteniendo la muestra a evaluar. ....	52

Figura 19. Stock de muestras colectadas en tiempos determinados que se conservaron a - 80 °C.....	53
Figura 20. Procesamiento de las muestras a analizar: A) Ubicación de las muestras para ser centrifugadas. B) Muestras centrifugadas.....	53
Figura 21. Análisis del sobrenadante. Para una adecuada lectura de las muestras se realizó una dilución de 1/10 por cada muestra.....	54
Figura 22 Curva de calibrado de Methamidophos.....	55
Figura 23 Curva de calibrado de Atrazina.....	56
Figura 24 Grafica de distribución normal para la primera repetición.....	57
Figura 25 Grafica de distribución normal para la segunda repetición (época 2).....	57
Figura 26 Grafica de distribución normal para la tercera repetición.....	58
Figura 27 Prueba de Índice de Correlacion (IC) para dos varianzas.....	59

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Diagrama de Metodología del proceso de biodegradación de Atrazina y Methamidophos .....	48
Anexo 2 Registro fotográfico del procedimiento de biodegradación de Atrazina y Methamidophos por <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	49
Anexo 3 Realización de curvas de calibrado .....	55
Anexo 4 Determinación de Normalidad en las 3 épocas .....	57
Anexo 5 Análisis estadístico.....	59

## Resumen

La actividad agrícola es de gran importancia para la economía del Perú, y es en esta en donde se da el empleo de plaguicidas para el cuidado de los campos de cultivo. En tal motivo en los campos de cultivo agrícola de Ancash, así como de la mayor parte del país el uso de plaguicidas o derivados de Atrazina y Methamidophos son utilizados debido al amplio espectro y rápida respuesta frente a las necesidades que tienen los agricultores por mantener sus cultivos ante el ataque plagas que puedan desarrollarse junto con los cultivos de interés.

Sin embargo, el uso de estos plaguicidas tiene una repercusión en el medio ambiente, que si bien es cierto el estado está haciendo lo posible por regular el uso de los plaguicidas químico, aun estos siguen siendo la mejor salida frente al ataque de plagas. Uno de los principales elementos que son contaminados en la actividad agrícola es el agua puesto que al aplicarse plaguicidas estos se lavan y son vertidos a los canales de agua que abastece tanto para las propias actividades agrícolas y ganaderas como para el consumo humano.

El trabajo se realizó en escala de laboratorio, en donde se evaluó la biodegradación para los plaguicidas Atrazina y Methamidophos en medio líquido. Los tratamientos fueron *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* que se colectaron de suelos agrícolas con presencia de plaguicidas, y se inoculó 1mL en los matraces con medio líquido (caldo nutritivo) a una escasa de  $3 \times 10^8$  bacterias/mL, determinada por la escala de McFarland. Los datos se bloquearon de acuerdo a las 3 primeras etapas de crecimiento microbiano (latencia, exponencial y estacionaria).

Palabras claves: Biodegradación, agricultura, plaguicida, *Pseudomonas*.

## Abstract

Agricultural activity is of great importance to the Perú economy, and it is in this where the use of pesticides for the care of crop fields. For this reason, in the agricultural fields of Ancash, as well as in most of the country, the use of pesticides or derivatives of Atrazine and Methamidophos are used because to the broad spectrum and rapid response to the needs of farmers to maintain their crops before the attack plagues that can develop along with the crops of interest.

However, the use of these pesticides has an impact on the environment, and while it is true. The state is doing its best for the regular use of chemical plagucides. One of the main elements that are contaminated in the agricultural activity is the water that the pesticides, these are washed and are the water channels that are supplied for both activities and for human consumption.

This investigation was made at the laboratory, where biodegradation was evaluated for Atrazine and Methamidophos pesticides in liquid medium. The treatments were: *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas Fluorescen* and *Pseudomonas putida* collected from soils, agriculture, presence, pesticides, and 1 ml was inoculated into the flasks with liquid medium (nutrient broth) at a  $3 \times 10^8$  bacteria/ml. low of McFarland. The data is blocked according to the first 3 epatas of microbial growth (latency, exponential and stationary).

**Keywords:** Biodegradation, agriculture, pesticide, *pseudomonas*.

## I. INTRODUCCION

Los plaguicidas se refieren a los herbicidas, fungicidas e insecticidas que son empleados en el campo agrícola e industrial en todo el mundo debido a su alta efectividad en el manejo agronómico de los cultivos. El porcentaje de tierra usada es de 55% en el desarrollo de la producción agrícola y en países subdesarrollados usan aproximadamente el 26%, porcentajes que refiere al total de plaguicidas producidos en el mundo. Estos son esenciales para proteger las cosechas, caso contrario las pérdidas en la producción mundial alimentaria ascenderían a 45 % aproximadamente (Mendoza *et al.* 2011). Para alimentar a la población a nivel mundial, la presión sobre la agricultura se ha incrementado enormemente, siendo obligatorio para los agricultores obtener un mejor rendimiento en la cosecha a cualquier costo; el uso de plaguicidas aumenta para proteger la cosecha del ataque de las plagas (Kanade *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, durante las últimas décadas los residuos generados por plaguicidas causaron una alta contaminación en los ecosistemas terrestres, específicamente en los recursos del suelo, aire y agua, provocando envenenamiento de alimentos (Carvalho, 2017); (Bansal, 2012).

Los plaguicidas en su mayoría no pueden distinguir entre las plagas y otros organismos incidentales similares debido a su alta actividad biológica y toxicidad por esta razón ocupan una posición única entre los contaminantes ambientales (Yadav & Devi, 2017). La dispersión y permanencia de los plaguicidas permitió llegar hasta zonas difíciles en el suelo esto provocó la contaminación del ambiente (contaminación difusa), esto afecta considerablemente los factores bióticos y abióticos, generando la bioacumulación de ellos en todos los niveles de las cadenas tróficas del medio ambiente (Atterby *et al.*, 2002 & Chaudhry *et al.*, 2005). El uso extensivo de plaguicidas ha presentado riesgos con los seres vivos y el medio ambiente. Estos químicos se han convertido en una tendencia a la persistencia en el medio ambiente debido a que la solubilidad con el agua, la adsorción en el suelo, se filtran en el medio ambiente por mucho tiempo (Jaiswal *et al.*, 2017; Lhomme *et al.*, 2008).

Se estima que solamente el 0.1% de los plaguicidas aplicados vía foliar alcanza al organismo objetivo, mientras que el resto se deposita en superficies de las plantas o tejidos, tierra, agua y aire y finalmente alcanza organismos fuera del objetivo, incluidos los humanos (Velmurugan *et al.*, 2017) . La aplicación continua de plaguicidas por parte de los agricultores es alarmante (Huang *et al.*, 2018). La existencia de residuos organofosforados y permanencia en diferentes medios incluyendo aire, suelo, cuerpos de agua, vegetales, sangre, orina, tejidos humanos y otros animales se detectaron en todo el mundo, estos estudios provienen entre 1986 hacia adelante (Velmurugan *et al.*, 2017).

La degradación de plaguicidas consiste descomponer los compuestos químicos tóxicos y compuestos no tóxicos, en algunos casos vuelven al compuesto original (Vargas, 1975). Se clasifica en tres tipos de degradación del plaguicida, la fotodegradación, degradación microbiana (biológica) y degradación química. La fotodegradación se realiza por la exposición de luz especialmente del sol, y puede destruir los pesticidas en el follaje de la superficie del suelo e incluso en el aire (Kiss & Virág, 2009). La degradación microbiana es el efecto de plaguicidas descompuestos por hongos, bacterias y otros microorganismos que utilizan plaguicidas como fuente de alimento (Foster *et al.*, 2004). La degradación química y biológica tiene relación y es difícil establecer una independencia de los dos procesos. Para una degradación química se tendría que recurrir a una destrucción de los microorganismos del suelo. Por tanto, ambos tipos se unen y se tratan como degradación bioquímica (Navarro & Barba, 2019).

La contaminación por plaguicidas es crítica, debido a esto, dio origen la necesidad de una búsqueda exhaustiva e investigación de procesos y técnicas biológicas para la descomposición, seguido de su eliminación por degradación de agentes biológicos, donde se aplica el uso de microorganismos (bacterias y hongos) que juegan el rol de catalizadores. Esta estrategia sofisticada de degradación tiene bajos costos, y puede desarrollarse *in situ* lugar donde se identifica como ambiente contaminado o problema A diferencia de otros métodos, la biodegradación promete resultados más

efectivos, con costos bajos para eliminar los contaminantes presentes en agua y suelos (Rojas, 2016). La literatura e investigaciones existentes hasta la actualidad presentan un panorama general de la gran cantidad de plaguicidas que se vierten al ambiente ocasionando altos riesgos para la salud humana y la vida silvestre. Referente a los plaguicidas más usados en la agricultura, se encuentra Atrazina y Methamidophos, por su la frecuencia de uso en los cultivos para el control de diversas plagas y enfermedades en todo el mundo, además de estar catalogados como carcinógenos.

Con el objetivo de minimizar o eliminar las propiedades tóxicas de estos plaguicidas en el ambiente, se han aislado del suelo, cuerpos de agua, diversos géneros de bacterias como por ejemplo Gram negativas como *Rhizobium sp*, *Sphingomonas sp*, *Pseudomonas sp*, *Burholderia sp* y bacterias que pertenecen al grupo heterogéneo de los metilótrofos facultativos como *Aminobacter ciceronei* que son capaces de degradarlos, los cuales hidrolizan, reducen u oxidan el compuesto bajo un proceso de biorremediación, en un tiempo más corto que bajo condiciones naturales (Ortiz *et al.*, 1997 & Castellanos *et al.*, 2013) ). La degradación del plaguicida en el medio ambiente y en el suelo se disipa tan pronto como se controlan las plagas o enfermedades. En vista de esto, se llevó a cabo la presente investigación en la que se han realizado ensayos para descubrir la capacidad de degradación de Atrazina y Methamidophos con bacterias *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* en condiciones de laboratorio.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Comprobar la biodegradación de Atrazina y Methamidophos por *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* en condiciones de laboratorio.

### **2.2. Objetivo Específicos**

Demostrar la degradación de Atrazina y Methamidophos por *Pseudomonas sp* en condiciones de laboratorio.

Demostrar la degradación de Atrazina y Methamidophos por *Pseudomonas putida* en condiciones de laboratorio.

Demostrar la degradación de Atrazina y Methamidophos por *Pseudomonas fluorescens* en condiciones de laboratorio.

Comparar la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* en condiciones de laboratorio.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Los plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias que se usan de manera intensiva para controlar plagas agrícolas e insectos vectores de enfermedades en humanos en los animales, así como, para el control de insectos y ácaros que, estos afectan considerablemente el proceso de cultivo, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos obtenidos en la producción agrícolas y obtención de madera (FAO, 2003). Estas sustancias pueden ser orgánicas o inorgánicas que se emplean en las actividades agrícolas para favorecer y mejorar los alimentos cultivados, obteniendo un aumento de producción, su uso es indispensable debido al incremento demanda mundial por alimentos (Consejo de Salubridad General, 2011).

La población humana está en constante crecimiento, se espera que sea de 9.100 millones en 2050 (ONU 2005), requerirá una mayor producción agrícola, el aumento de la producción agrícola depende del uso de agroquímicos, demostrado en el crecimiento del mercado agroquímico en aproximadamente 4.5 % anual (Bansal, 2012). De acuerdo a la alta demanda de producción agrícola por el crecimiento de población el mercado mundial por su alta demanda causa el uso extenuante de la tierra, el cual provoca la aparición de organismos depredadores del suelo, siendo estos los causantes de enfermedades en los cultivos generando pérdidas económicas muy altas; una de las soluciones a esta problemática fue comercializar numerosos plaguicidas, los cuales son eficientes

es la mayoría de los casos pero como consecuencia producen daños severos al medio ambiente, contaminando el suelo cultivado y sus alrededores a la vez corrientes de agua (Zehnder *et al.*, 2000). La presencia de metabolitos residuales de plaguicidas en los alimentos, agua y suelo, actualmente es uno de los temas representativos para la química dedicada al estudio ambiental (Mostafa, 2010).

Los plaguicidas se clasifican en herbicidas, fungicidas, insecticidas, los cuales son ampliamente utilizados en la producción agrícola y la industria a nivel mundial por su alta efectividad; pero como consecuente es la contaminación de agua empleada para los cultivos, generando un gran impacto en la salud ambiental (Mendoza *et al.* 2011; Rodríguez *et al.*, 2009).

En la tabla 1y 2 se mencionan los plaguicidas que se usarán en el estudio, según el registro según DIGESA que detalla el nombre comercial, nombre común, país de origen y el titular del registro (SENASA 2016).

Tabla 1 .Lista de Plaguicidas empleados en la actividad agrícola con registro vigente.

Nº DE REGISTRO	NOMBRE COMERCIAL	NOMBRE COMÚN	PAIS DE ORIGEN	TITULAR DEL REGISTRO
104-96-AG- SENASA	MONOFOS	METHAMIDOPHOS	PERÚ	FARMAGRO S.A.
669-98-AG- SENASA	ATRANEX 80 WP	ATRAZINA	ISRAEL / PERU / COLOMBIA	PROFIANDINA PERU S.A
671-98-AG- SENASA	MAICERO 80 PM	ATRAZINA	COLOMBIA	BAYER S.A
903-99-AG- SENASA	FARMEZIN 80	ATRAZINA	PERÚ	FARMEX S.A

Fuente: SENASA 2016.

La producción comercial de los plaguicidas es en una escala mayor para los herbicidas, seguida de los insecticidas y funguicidas. En cuanto a consumo monetario en el año 2005 a nivel mundial fue de 31.10 millones de dólares, donde el 47% fue para herbicidas, 25% para insecticidas y el 24% para funguicidas (Bedmar, 2011).

Tabla 2. Cuadro resumen que muestra los ingredientes activos de los plaguicidas químicos en estudio, datos registrados al 31 Agosto del 2017 ante el SENASA.

N° EMPRESA SOLICITANTES	Ingrediente Activo	Clase	Tipo de Formulación	Tipo Producto
14	METHAMIDOPHOS	Insecticida	Concentrado soluble	Plaguicida químico de uso agrícola
5	ATRAZINE	Herbicida	Suspensión concentrada	Plaguicida químico de uso agrícola

Fuente: Cruz Escalon,( 2017).

En el Perú a través del Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades el Ministerio de Salud (MINSa) reporta casos de toxicidad de los plaguicidas por regiones. En donde se indica que la región Ancash ocupa el 4 lugar de mayor incidencia de casos por plaguicidas (Tabla 3).

Tabla 3 Tasa de incidencias por departamentos

Record	Departamentos	2018			2019		
		casos	%	TIA x 100000 hab.	casos	%	TIA x 100000 hab.
1	Lima	502	48.3	7.8	521	46.5	7
2	Arequipa	144	13.8	14	200	17.9	19.1
3	Junin	76	7.3	9.2	69	6.2	9.3
4	Ancash	49	4.7	7.9	52	4.6	8.9
5	Tacna	2	0.2	0.9	45	4	14.3

Fuente: MINSa, 2019

Así mismo el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades por medio del Ministerio de Salud (MINSa) indica los plaguicidas más usados según el tipo (Figura1) (MINSa, 2019).

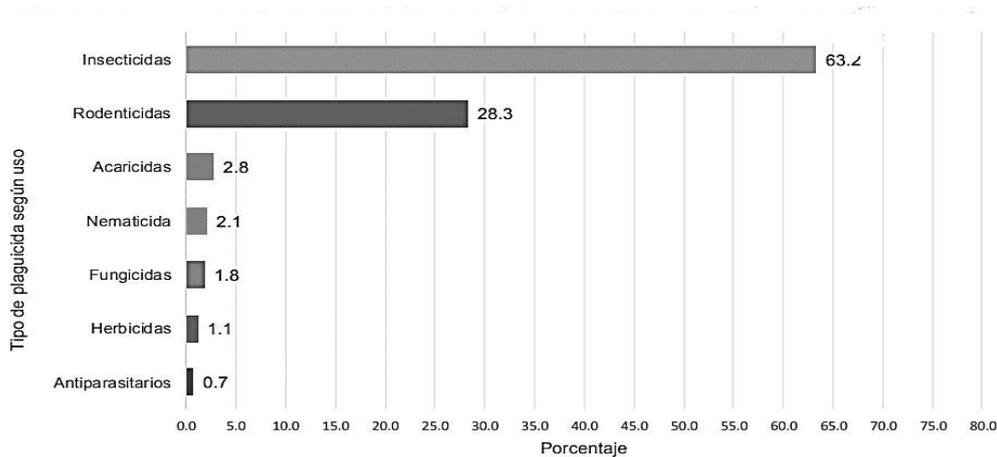


Figura 1. Plaguicidas utilizados en la exposición según su tipo y frecuencia de uso, datos reportados en el Perú 2019. Fuente: Datos obtenidos en el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA. (\*) Hasta la SE 25 - 2019

### 3.1.1. Atrazina

Pertenece al grupo de herbicidas triazínicos organoclorados (Fig.1), con fórmula química 6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1, 3,5-triazina- 2,4-diamina (Rippen, 1999). Modo de acción de atrazina es bloqueando el transporte de electrones en el fotosistema II el cual conduce a la desintegración de la clorofila y al bloqueo de la fotosíntesis (Nwani *et al.*, 2010); actúa en la planta de forma sistémica y residual, el modo de aplicación es vía drench o pulverizado al suelo, con fines de controlar la germinación y crecimiento de malezas, las malezas lo absorben por las raíces trasladándose en de la parte basal hacia el ápice de la planta por el xilema distribuyéndose a otras partes de la planta donde cumple su acción, como en los meristemas apicales y todo el sistema de las hojas, impidiendo la fotosíntesis y otros procesos enzimáticos. Es absorbida también por las hojas de las plantas (Esteban, 2016). Los cultivos empleados comúnmente es la caña de azúcar, maíz, piña, sorgo, nueces de macadamia, en los bosques de árboles de hoja perenne y para el rebrote de bosques perennes. También se ha usado para evitar que las malezas crezcan tanto en las vías de la carretera. Otra forma de aplicación es esparciendo en las tierras de cultivo antes de que los cultivos comiencen a crecer y después de que hayan emergido del suelo (ATSDR, 2013).

Su uso actualmente es material de controversia ya que produce efectos nocivos en especies a las que no va dirigida debido a su amplio espectro, algunas de las clases de animales afectadas son los anfibios a causa de la contaminación de las aguas (Rippen, 1999). La causa de encontrar Atrazina en cuerpos de agua es por

el poder de persistencia, alta solubilidad y dispersión, por el contrario baja absorción en el suelo (Hansen *et al.*, 2013), en algunos países como Europa su uso está prohibido, y en otros países es restringido, debido a que es considerado como altamente contaminante del agua potable (Sanchez Camazano *et al.*, 2005). La descomposición de Atrazina es lenta en los cuerpos de agua por ende cualquier residuo presente en arroyos, ríos y lagos permanecerá por un largo tiempo. También persistirá durante mucho tiempo en las aguas subterráneas. Esta es una de las razones por las cuales la atrazina se encuentra comúnmente en el agua recolectada de los pozos de agua potable en algunas regiones agrícolas (ATSDR, 2013).

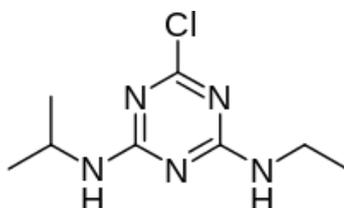


Figura 2. Molécula de Atrazina (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>).

La permanencia residual de un herbicida en ambientes como el suelo es definido como el período o longitud de tiempo durante el que permanece en forma activa existiendo la posibilidad de generarse efectos fitotóxicos. La familia de herbicidas residuales los cuales presentan componentes persistentes son Triazinas, trazonolinonas, Uracilos, Fenilureas, etc (Tabla 4.).

Tabla 4. En la tabla se detalla las familias de herbicidas que presentan componentes potencialmente persistentes en el ambiente.

Triazinas	Triazinonas	Uracilos	Fenilureas	Dinitroanilinas	Sulfonilureas	Imidazolinonas	Hormonales
<b>Atrazina</b>	metribuzin	bromacil	diuron	dinitramina	clorimuron	imazamox	clopiralid
simazina		terbacil		pendimetalin	metsulfuron	imazapir	picloram
				trifluralina	nicosulfuron	imazaquin	triclopir
					primisulfuron	imazetapir	
					prosulfuron	imazapic	

### 3.1.2. Metamidophos

Es un plaguicida organofosforado con alta toxicidad de amplio espectro y puede afectar significativamente los microbios del suelo (Wang *et al.*, 2008), soluble en agua menor a una concentración de 200 g/l a 20°C (Fig.2), su nombre químico es O, S-dimetil fosforamidotioato, es un insecticida y acaricida utilizado para controlar múltiples plagas hortícolas y agrícolas (Authority, 2014). Ligeramente soluble en alcoholes y cetonas, poco soluble en éter y éter de petróleo. Modo de descomposición al calentar evitando la ebullición; se mantiene estable a un pH de 3-8. El modo de acción de methamidhpos afecta directamente el sistema nervioso para inhibir la acetilcolinesterasa, enzima esencial para la transmisión normal de los impulsos nerviosos (IPCS, 1993).

Pesticida utilizado ampliamente con fines de control que abarca una gama amplia de insectos (Athanasopoulos *et al.*, 2005). También controla insectos masticadores, chupadores y ácaros en plantas ornamentales, cítricos, frutas, en diversos cultivos. Sin embargo, contamina al medio ambiente por varias fuentes como efluentes industriales, escorrentía agrícola y derrames químicos (D Baylis, 2000). Se ha reportado que Metamidhpos en casos relacionados con la inhibición de colinesterasa en humanos, sobreestimar el sistema nervioso a la vez puede causar náuseas, mareos, confusión y en el caso de exposiciones muy altas ( como accidentes o derrames importantes) presente parálisis respiratoria y muerte (EPA, 2002).

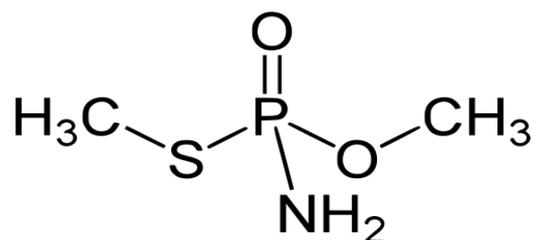


Figura 3. Formula de Methamidophos (C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>PS).

### **3.2. Degradación de plaguicidas**

La importancia del estudio de degradación de plaguicidas es de gran importancia, se ha encontrado en algunos casos que pueden bioacumularse en las cadenas tróficas, con la probabilidad de persistir en el medio ambiente por un largo tiempo (Ferrer, 2003). Los métodos de tratamiento de descomposición en plaguicidas que transfieren de una fase a otra como el tratamiento biológico en el que algunos transforman compuestos peligrosos a compuestos con estructura más simples es un reto crucial en el mundo. Sin embargo, al existir algunas limitaciones de los sistemas de biotratamiento como por ejemplo el potencial tóxico de agentes xenobióticos. En el campo experimental significa que se debe tener sumo cuidado con los microorganismos utilizados porque pueden ser inhibidos o causar su muerte a causa de los efectos tóxicos de los contaminantes orgánicos (Beshay *et al.*, 2002). Respecto a la biodegradación, el plaguicida tiene el rol de ser la única fuente de carbono y energía para los microorganismos utilizados, en los que se incluye la síntesis de las enzimas apropiadas para la transformación de este, en el que proporciona un mecanismo importante en la degradación de compuestos xenobióticos en el ambiente y como resultado se reduce los niveles de contaminación generados por estos (Murugesan *et al.*, 2010).

Los malos manejos de los componentes residuales provenientes de plaguicidas generan la contaminación en todos los ambientes, debido a esta problemática se ha buscado métodos eficientes de degradación, ya sean abióticos o bióticos (Burrows *et al.*, 2002). Referente al método biótico con la aplicación de tecnologías como la biorremediación que degrada, inmoviliza o mineraliza compuestos xenobióticos usando consorcios biológicos (Navarro *et al.*, 2007, Singh 2008).

El saneamiento biológico (biorremediación) consiste en procesos naturales que emplean microorganismos con capacidad de degradación disminuyendo o eliminando la peligrosidad, entre ellos se encuentran las bacterias y hongos (Cook & Westlake, 1972 ). La mineralización descompone las moléculas inorgánicas como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O obteniendo como resultado una biotransformación en caso se dé la degradación parcial de componentes secundarios sea menos tóxicos (Scherer,

1996; Eweis *et al.*, 1999; Levin & Gealt, 1997). El objetivo principal de la biorremediación es la degradación o descomposición de residuos tóxicos que convierte en componentes más simples con baja o nula agresividad al medio ambiente (Ellis *et al.*, 2001). Estudios enfocados en el uso de hongos para la pudrición blanca de la madera se basó debido a que tienen la capacidad de biodegradar y mineralizar la lignina empleando un sistema enzimático extracelular (Quintero Díaz, 2011).

### **3.2.1. Degradación de Atrazina**

Los principales procesos como la adsorción y la mineralización en los suelos participan en la atenuación y el comportamiento de la atrazina, para evitar efectos el suelo por el contenido de arcillas y de materia orgánica (Hansen *et al.*, 2013). Otra problemática es el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados no sólo afectan al suelo si no que inhiben la mineralización de la atrazina (Guillén *et al.*, 2007); el maíz es uno de los cultivos más comunes el cual al momento de la aplicación del herbicida se complementa con una fertilización nitrogenada para obtener una mejor producción (Andriulo *et al.*, 2004; Uhart & Echevarria, 1995). Es más complicado obtener una degradación de Atrazina en el agua a diferencia del suelo, por esta razón es importante evitar que este plaguicida llegue a parar en agua superficiales y y peor aún en aguas subterráneas (Guillen, Hansen, & Van , 2007).

En suelos con pH 7 la degradación bacteriana para la eliminación de atrazina es óptima a estas condiciones (Ostrofsky, Robinson, Traina, & Tuovinen, 2002); la atrazina funciona como fuente de nitrógeno y energía para los microorganismo (Yunda & Fuentes, 2001). En el proceso de degradación los microorganismos usan las moléculas del plaguicida como fuente de energía, el plaguicida es utilizado de alguna manera por uno o más microorganismos y metabolizado hasta CO<sub>2</sub> y otros componentes inorgánicos. Los microorganismos mineralizan la atrazina hasta amonio y anhídrido carbónico, así como también degradan en productos intermedios de variada persistencia y toxicidad como la hidroxiatrazina, desetilhidroxiatrazina, desisopropilhidroxiatrazina y ácido cianúrico. La

completa mineralización evita la generación de metabolitos de carácter tóxico (Da Cunha et al., 2012; C et al., 2001).

### **3.2.2. Degradación de Metamidophos**

La descomposición de metamidophos es de nivel medio, se da según el tipo de ambiente en la que se encuentra así tenemos un valor de 1.9 días en limo (mezcla de arcilla y arena fina, sedimento transportado por los ríos), 4.8 días en suelo franco (suelo arcilloso), 6.1 días en arena y 10 a 12 días en suelo franco arenoso. Es altamente móvil en los suelos, sobre todo en los arenosos y por ello puede lixiviar hasta aguas subterráneas. Los productos de degradación en el suelo son el CO<sub>2</sub>, mercaptán, sulfuro de dimetilo y disulfuro de dimetilo (Christiansen et al., 2011).

Con respecto a su vida media en aguas alcalinas (pH 9) es de 3 días, pero puede prolongarse a 27 días en aguas neutras (pH 7) y 309 días en aguas medianamente ácidas (pH 5). Es susceptible a la fotólisis directa en suelo y agua, pero en este último medio suele ser lenta (vida media de 87 días) (Christiansen et al., 2011).

Su biodegradación se ve acelerada en presencia de radiación solar, un ejemplo de ello es la reducción de la vida media en el agua a pH 5 de 309 días a solamente 90 días (Campos & Palacios, 2010).

### **3.3. Rol de las *pseudomonas* en la degradación de los plaguicidas**

Tal como se indicó en la biorremediación es crucial el uso organismos como bacterias, hongos, también se incluye el uso en conjunto de organismos conocidos como consorcios microbianos y por último también se usan plantas (Atterby et al., 2002). En el caso de las bacterias Gram negativas el género de las *Pseudomonas* disponen de gran versatilidad metabólica, debido a que presentan plásmidos que catabólicos, con genes que codifican para enzimas involucradas en la degradación de una amplia variedad de compuestos complejos transformándolos en compuestos simples, siendo esta actividad

resaltante que hace que otro grupos de bacterias no lo metabolicen fácilmente (Jacoby, 1986; García & Guerrero, 2004). *Pseudomonas* contiene rutas metabólicas de degradación de solventes sintéticos hidrocarburos aromáticos, herbicidas e insecticidas (Ellis *et al.*, 2001).

*Pseudomonas* es del grupo de bacterias presentes en gran cantidad en el suelo por lo que por medio de la mineralización descomponen compuestos complejos, son metabólicamente adaptables y tienen capacidad para degradar la mayor parte de los hidrocarburos aromáticos, aceite, productos derivados del petróleo y plaguicidas (Sarkar *et al.*, 2009). Además de ello, *Pseudomonas* tiene la capacidad de mineralizar compuestos fenólicos, incluyendo los hidrocarburos alifáticos clorados también fueron metabolizados debido a la gama diversificada de vías catabólicas por tanto es el más utilizado en el proceso de degradación (Gilani *et al.*, 2016).

### **3.3.1. *Pseudomona putida***

Bacterias mesófilas presentan crecimiento óptimo en condiciones de temperatura entre 25-30°C y con un pH de 6 – 8 esto facilita el aislamiento del suelo y agua a condiciones de laboratorio, por ser Gram-negativas en forma de varilla, respecto a su sistema de crecimiento es de metabolismo aeróbico (Harwood *et al.*, 1989). *P. putida* es ampliamente usada en tecnologías innovadoras conocidas como biotecnológicas que está presente en la agricultura, biocatálisis, biorremediación y también en la producción de bioplásticos (Daane *et al.*, 2001). Su metabolismo permite que estas bacterias conviertan disolventes orgánicos nocivos en compuestos no tóxicos que son tan esenciales para la biorremediación (Velazquez, 2004). *P. putida* también tiene capacidad de colonizar la rizosfera de plantas y por su alta capacidad metabólica permite el desarrollo de controladores biológicos y PGPR (promotores de crecimiento de la planta (Rockne *et al.*, 2000).

### **3.3.2. *Pseudomona fluorescens***

*Pseudomonas fluorescens* es bacilo móvil Gram negativo que son principalmente aeróbicos y crecen a un pH entre 4-8, incapaces de fermentar glucosa, tiene una capacidad metabólica versátil por lo que puede persistir en una amplia gama de entornos y la plasticidad de algunas cepas para adaptarse al crecimiento a temperaturas más altas, esto dependerá del lugar que fue aislado. Son comunes del suelo que pueden mejorar la salud de las plantas a través de los ciclos de nutrientes, el antagonismo de patógenos y la inducción de defensas de las plantas (Scales *et al.*, 2014; Mark *et al.*, 2009). *P. fluorescens* elimina ciertas toxinas y contaminantes, entre ellos estireno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, y TNT (Zhao *et al.*, 2006). También protegen a las plantas evitando la infección por patógenos mediante la producción de metabolitos secundarios como los antibióticos y el cianuro de hidrógeno que matan a otras bacterias y hongos. A su vez frena a otros patógenos por exclusión competitiva debido a su rápida colonización (Srivastava. 2009). *P. fluorescens* produce gran diversos metabolitos algunos de ellos son antibióticos compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas (Showkat *et al.*, 2012).

### **3.4. Antecedentes de los plaguicidas**

La utilización inadecuada y excesiva de plaguicidas afecta intensamente al ambiente especialmente en la calidad del agua por consecuente la salud pública, existen estudios relacionados con esta problemática. En Lituania la FAO (1994), presentó casos continuos de contaminación del agua con residuos de plaguicidas, esto se debió a un mal manejo de almacenamiento y distribución de los productos agroquímicos. Desde hace algunos años, diversos investigadores han empezado a evaluar la toxicidad de los plaguicidas en el agua. Susuki *et al.* (2003) en Japon detectaron la presencia de simetrin, iprobenfós y otros residuos de plaguicidas en agua de lluvia causando alarma en la población. En la India, Kumari *et al.* (2008) investigaron muestras de suelo y agua teniendo como resultados la presencia de plaguicidas entre ellas están los HCH, DDT, endosulfán, clorpirifós y otros productos organofosforados que alteraron los límites permitidos en agua potable (Rand *et al.*, 2010).

En Canadá, Xing *et al.* (2012), realizaron análisis para medir la calidad de agua en las cuencas y la zona marina detectando la presencia de clorotalonil, atrazina, endosulfán y otros plaguicidas en la mayoría de los puntos de muestreo del país. Estudios realizados en pozos de agua proveniente del subsuelo en el Ontario sudoccidental agrícola (Canadá), el 35% de los pozos dieron positivo en las pruebas de plaguicidas (Lampman, 1995). Estados Unidos en áreas agrícolas y zonas aledañas comprobó que el 10,4 por ciento de los pozos comunitarios y el 4,2 por ciento de los pozos rurales contenían niveles detectables de uno o más plaguicidas datos obtenidos del el Estudio Nacional de Plaguicidas de US-EPA (1992).

En España estudios realizados identificaron que la Comunidad Autónoma de Canarias es la que utiliza más pesticidas en su agricultura causando toxicidad del suelo y agua (Zumbado *et al.*, 2004), siendo una problemática que ha generado un impacto ambiental debido a que existen evidencias de restos de pesticidas en aves de Canarias (Mateo *et al.*, 2000). Posteriormente en Venezuela determinaron residuos de plaguicidas en agua para el consumo humano, agua obtenida de seis acueductos del Estado de Mérida, zona que reporta alta actividad agrícola (García *et al.*, 2011).

Ante la problemática de los plaguicidas Sanchez *et al.*, (2014) demostraron la degradación de dimetoato y metomilo por oxidación catalítica con óxido de Hierro (III) a base de carbón activado resultados muestran una disminución de la DQO del Dimetoato obteniendo 57,8% y 67,2%, y una disminución de la DQO del Metomilo entre el 17,7 % y el 24,7 %.

García *et al.*, (2014) al realizar un estudio en Colombia detecta antecedentes alarmantes en análisis rutinarios de límites permisibles en áreas de almacenamiento y suelos contaminados con alta presencia de plaguicidas organoclorados. Al tener antecedentes de este tipo realizaron estudios de remediación del suelo contaminado con el pesticida 1,1,1-Tricloro- 2,2'bis (P-Clorofenil) Etano (Ddt) con el uso de protocolos de bioestimulación y adición de surfactante

El Perú es un país con abundante área agrícola el cuál usa plaguicidas organofosforados, pese al control de productos químicos persistentes en el ambiente, existen datos de plaguicidas que se comercializan bajo denominaciones que corresponden a los contaminantes orgánicos persistentes (COP), los cuales fueron prohibidos en el año 1991 debido a su nivel de peligrosidad en el campo agrícola, estos plaguicidas organoclorados se caracterizan por su alta persistencia ambiental y los graves efectos a la salud (Montoro *et al.*, 2010). Guerrero, 2013, en su estudio identifica a Trujillo como una de las zonas costeras que tiene extensos cultivos como consecuencia uno de los pesticida más usados por los agricultores es el Tamaron (Metamidofos: O,S-Dimetil fosforoamidotioato), no obstante los agricultores realizan mezclas mortales de pesticidas en la aplicación de los diferentes cultivos originando una elevada persistencia de plaguicidas en el suelo y agua.

Montoro *et al.*, (2010) en una investigación realizada en dos provincias de Junin identificó los plaguicidas de uso frecuente en los cultivos siendo metamidofos el más usado con los siguientes nombres comerciales adquisición (Tamaron® y Monitor®), en segundo lugar está el parathion etílico (Parathion®) con frecuencia de uso de 1/20 agricultores a pasar de estar en la lista de productos prohibidos en base a la clasificación de extremadamente y altamente peligrosos, clasificación propuesta y regulada por la OMS (Tabla 5).

Tabla 5. Uso de plaguicidas poblaciones del Valle del Mantaro, Junín.

Plaguicidas	Concepción (n=210)	Chupaca (n=225)
Tamaron ® (metamidofos)*	44,6%	39,5%
Monitor ® (metamidofos) *	-	5,8%
Furadan ® (carbofuran) *	15,6%	15,1%
Caporal ® (cipermetrina) *	5,2%	14,7%
Sherpa ® (cipermetrina)**	9,2%	14,2%
Antracol ® (propineb)**	-	5,3%
Parathion ® (parathion etílico)***	4,9%	4,5%

Fuente: SCielo 2009.

\* Productos químicos Altamente y extremadamente peligrosos

\*\* Productos químicos Ligeramente peligrosos.

\*\*\* Productos químicos restringidos

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

- 1. Obtención de cepas:** Las cepas de bacterias Gram negativas *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*, se adquirieron de laboratorios de la Universidad Nacional de Trujillo y la Universidad Pedro Ruiz Gallo donde se emplearon los cultivos mencionados en otros trabajos de investigación.
- 2. Preparación del inóculo:** Las cepas de *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* se propagaron por separado en medio caldo LB, el cual se preparó como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Composición de caldo LB usado para el cultivo de *Pseudomonas*.

Medio	Reactivo	Concentración
Caldo LB	Extracto de levadura	5g/L
	Cloruro Sódico	10g/L
	Triptona	10g/L

- 3. Concentración del inóculo:** El inóculo de cada cepa obtenido tuvo una concentración bacteriana de  $3 \times 10^8$  bacterias/ml tubo de ensayo #1 la cual fué determinado por McFarland.
- 4. Acondicionamiento de los sistemas de cultivo:**
  - El cultivo en laboratorio se realizó en 8 matraces de 500 mL con 400 mL de medio caldo LB. Teniendo en cuenta que a los matraces se le agregó 1 mL de inóculo de cada cultivo bacteriano por separado (2 matraces con *Pseudomonas sp*, 2 matraces con *Pseudomonas fluorescens* y 2 matraces con *Pseudomonas Putida*) y los otros 2 se tomaron como testigos con los plaguicidas, se dejó 4 horas de acondicionamiento para las bacterias.

- Transcurrido el tiempo se adicionó los plaguicidas Atrazina y Methamidophos en concentraciones de 50 mg/L en temperatura ambiente, se colocaron por separados en cada uno de los matraces.
- Se incubó a 25°C, en un shaker a 90 rpm.

**5. Muestreo de la biodegradación:** Se tomó muestras de 3 mL, durante 22 días.

El muestreo se tomó de la siguiente manera:

- Cada 3 horas los 2 primeros días (fase de latencia)
- Cada 24 horas por 5 días (fase exponencial)
- Finalmente, cada 3 días por 15 días (fase estacionaria)

A estas muestras se les realizó una centrifugación a 5,000 rpm durante 15 minutos, para separar el paquete celular del sobrenadante (Mendoza, Perea, Salvador, Morales, & Pérez, 2011).

**6. Análisis de sobrenadante:** Al sobrenadante se le realizó un barrido espectral de 200nm – 1000nm en T80 Uv/Vis Spectrophotometer el cual determinó el porcentaje de biodegradación, de los plaguicidas Atrazina y Mehamidophos.

## V. Resultados y discusión

### a. Resultados

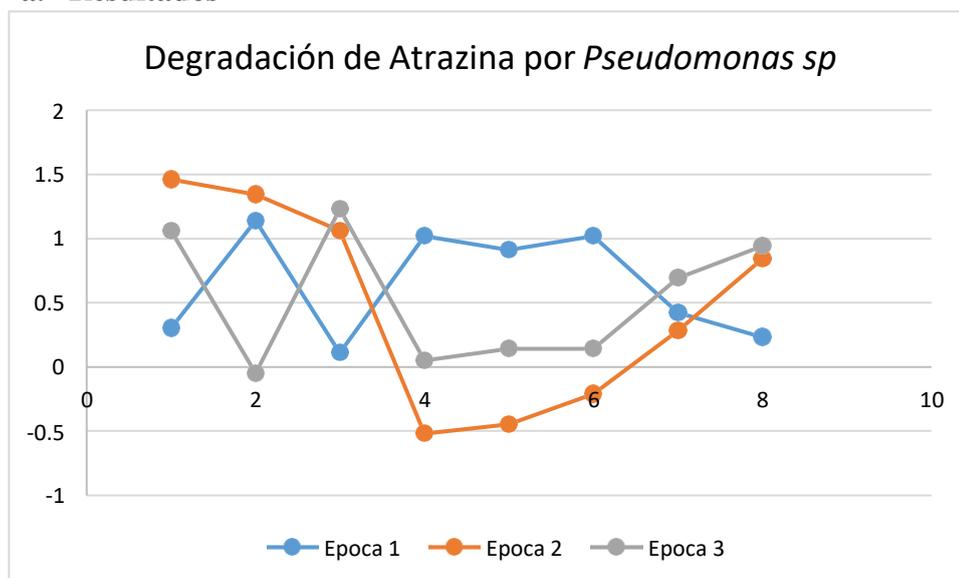


Figura 4. Degradación de Atrazina por *Pseudomonas sp*

En la figura 4 se observa el comportamiento de la biodegradación de Atrazina por *Pseudomonas sp* en las 3 épocas (repeticiones) que se realizó en el estudio.

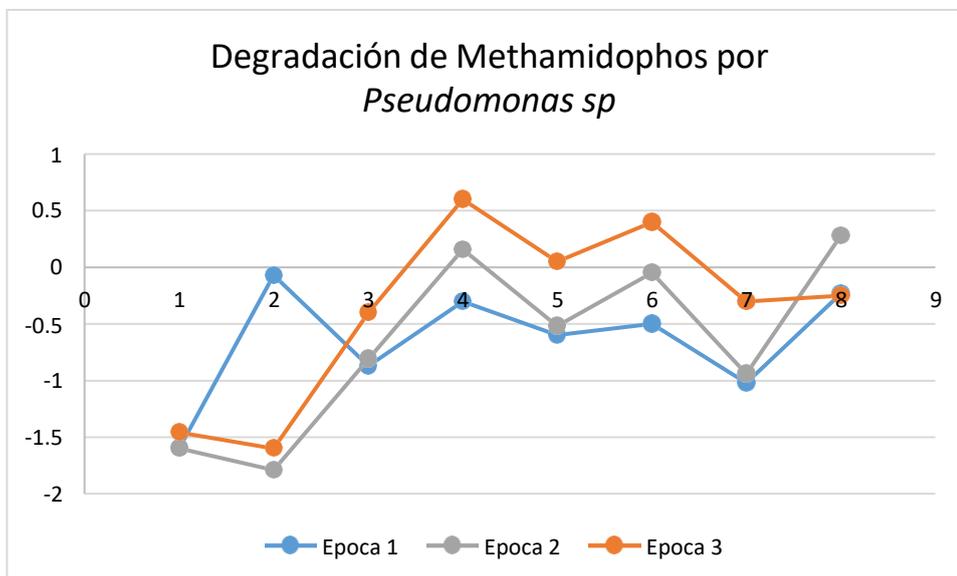


Figura 5. Degradación de Methamidophos por *Pseudomonas sp*

En la figura 5 se observa el comportamiento de la biodegradación de Methamidophos por *Pseudomonas sp* en las 3 épocas (repeticiones) que se realizó en el estudio. En esta grafica la biodegradación se muestra en las épocas (repeticiones) 2 y 3 son más semejante entre sí que la época (repetición) 1.

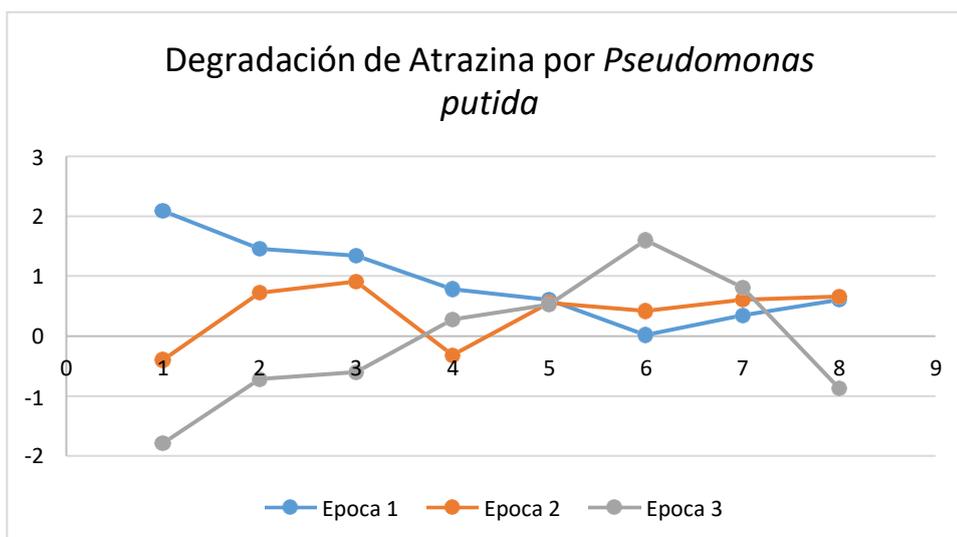


Figura 6. Degradación de Atrazina por *Pseudomonas putida*

Para el caso de Atrazina la biodegradación con *Pseudomonas putida* se observa un comportamiento más constante en las tres repeticiones, con ciertas diferencias con respecto a la repetición 3.

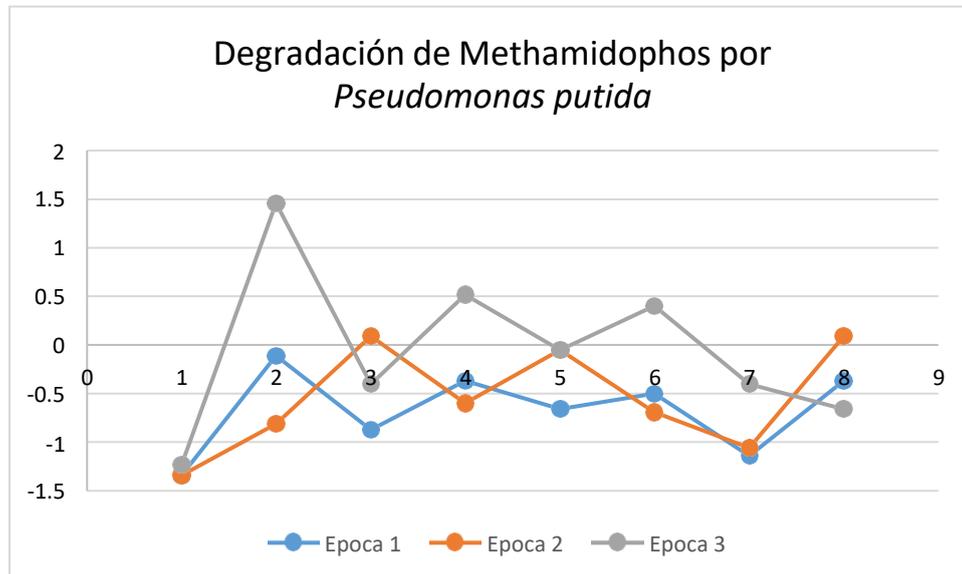


Figura 7. Degradación de Methamidophos por *Pseudomonas putida*

La biodegradación de Methamidophos por *Pseudomonas putida* se observa un comportamiento distinto para cada una de las repeticiones

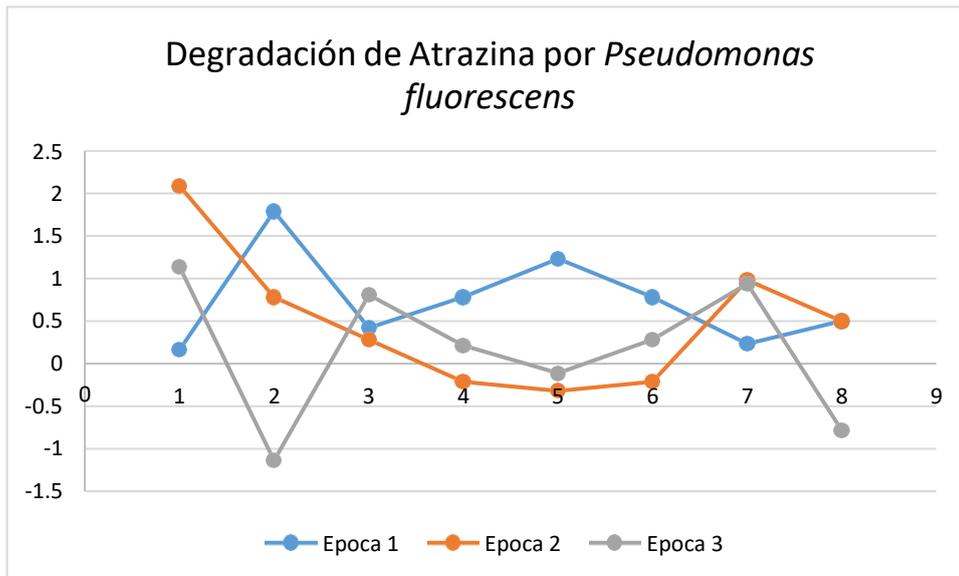
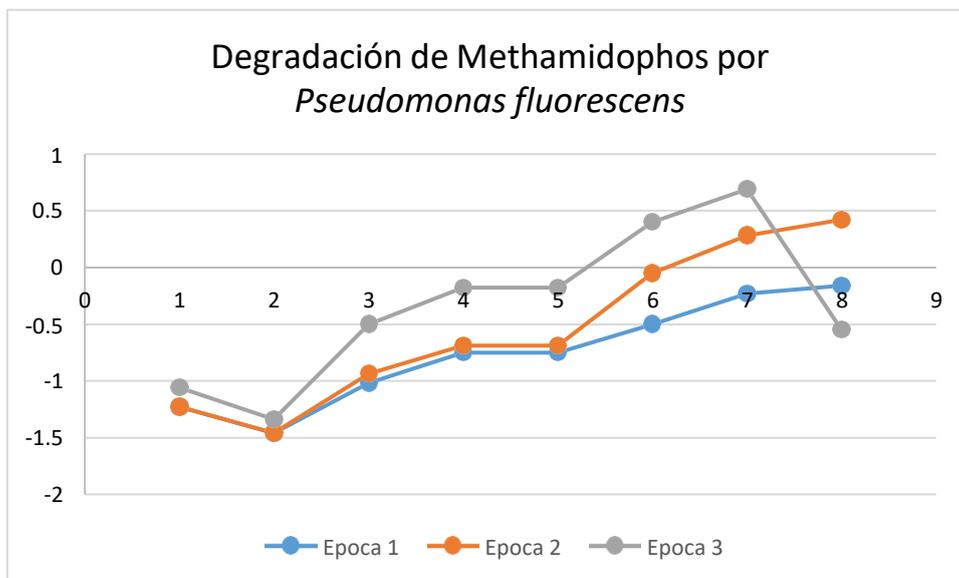


Figura 8. Degradación de Atrazina por *Pseudomonas fluorescens*

El comportamiento de la biodegradación de Atrazina con *Pseudomonas fluorescens*,



muestra un comportamiento similar en las tres épocas (repeticiones de estudio).

Figura 9. Degradación de Methamidophos por *Pseudomonas fluorescens*

La biodegradación de Methamidophos por *Pseudomonas fluorescens* se observa un comportamiento mucho más uniforme. Con respecto a todas las gráficas mostradas en esta se observa un comportamiento más uniforme para los fines de estudio planteado.

Cada uno de los datos recopilados pasó por un análisis estadístico de donde se puede tomar una mejor interpretación del comportamiento de cada uno de los tratamientos en estudio.

Tabla 7 Análisis de varianza para la 1 Repetición

Para la primera repetición (Tabla 7), podemos concluir que a un  $\alpha=0.05$  que los tratamientos utilizados ( $p=0.00$ ), muestran una diferencia significativa, esto quiere decir que para la biodegradación de Atrazina y Methamidophos los tratamientos con

---

Análisis de Varianza Para la segunda repetición (Época 2)

---

*Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas Fluorescente* no tienen una diferencia significativa, por lo que se concluye que estadísticamente los tratamientos estudiados mostraron una biodegradación similar para los plaguicidas.

Para el caso de los bloques de crecimiento microbiano con un  $p=0,897$  (latencia, exponencial y estacionaria) no existe una diferencia en la biodegradación, esto demostró

---

Análisis de Varianza Para la primera repetición (Época 1)

---

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	5	31.5862	6.31724	18.58	0.000
Bloque	2	0.0741	0.03707	0.11	0.897
Error	46	15.6394	0.33999		

---

lo que dicen las investigaciones que las *Pseudomonas* sintetizan y utilizan a los plaguicidas dentro de su metabolismo para el crecimiento de biomasa es decir las *Pseudomonas* toman de Methamidophos como de la Atrazina fuente de carbón y energía incluyendo la síntesis de las enzimas apropiadas (Murugesan *et al.*, 2010).

Tabla 8 Análisis de varianza para la repetición 2

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	5	8.959	1.7918	2.27	0.063
Bloque	2	2.005	1.0024	1.27	0.291
Error	46	36.347	0.7901		

---

Análisis de Varianza Para la tercera repetición (Época 3)

---

Para la segunda repetición (Tabla 8), podemos concluir que a un  $\alpha=0.05$  que los tratamientos utilizados ( $p=0.063$ ), muestran una diferencia estadísticamente no significativa, esto quiere decir que la biodegradación de Atrazina y Methamidophos con los tratamientos en estudio: *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* no se puede terminar cual sería el más efectivo para la biodegradación de Atrazina y Methamidophos, debido a que todos los tratamientos responden de igual forma para a biodegradación.

Para el caso de los bloques de crecimiento microbiano con un  $p=0.291$  (latencia, exponencial y estacionaria) Se mantuvo lo descrito en la primera repetición, que las *Pseudomonas* sintetizan y utilizan a los plaguicidas dentro de su metabolismo para continuar con el crecimiento de biomasa.

Para la tercera repetición (Tabla 9), podemos concluir que a un  $\alpha=0.05$  que los tratamientos utilizados ( $p=0.806$ ), no muestran una diferencia significativa, esto quiere decir que la biodegradación de Atrazina y Methamidophos con los tratamientos con *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* respectivamente no tienen una diferencia estadística significativa, por lo que se concluye que todos los tratamientos muestran un comportamiento similar para la biodegradación de Atracina y Methamidophos.

Tabla 9 Análisis de varianza para la época 3

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	5	2.131	0.4261	0.46	0.806
Bloque	2	2.342	1.1708	1.26	0.294
Error	46	42.840	0.9313		

Para el caso de los bloques de crecimiento microbiano con un  $p=0.294$  (latencia, exponencial y estacionaria) Se mantuvo lo descrito en la primera repetición, que las *Pseudomonas* sintetizan y utilizan a los plaguicidas dentro de su metabolismo para continuar con el crecimiento de biomasa.

Tabla 10 Análisis de varianza para las repeticiones 2 y 3

Para el análisis combinado (Tabla 10), podemos concluir que a un  $\alpha=0.05$  que los tratamientos utilizados ( $p=0.123$ ), no muestran una diferencia significativa, esto quiere decir que la biodegradación de Atracina y Methamidophos con los tratamientos de

Análisis de Varianza combinado (Repetición 2 y 3)					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	7	10.136	1.4479	1.67	0.123
Bloque	2	1.701	0.8504	0.98	0.378
Error	117	101.419	0.8668		

*Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* respectivamente, no tienen una diferencia estadística significativa; por lo que se concluye que todos los tratamientos muestran un comportamiento similar para la biodegradación de Atracina y Methamidophos.

Para el caso de los bloques que se hizo según el crecimiento microbiano con un  $p=0.378$  (latencia, exponencial y estacionaria) se comprobó que hay una diferencia en la biodegradación, esto ocurre porque las *Pseudomonas* sintetizan y utilizan a los plaguicidas dentro de su metabolismo para continuar con el crecimiento de biomasa.

**Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Degradacion, Término = Tratamiento**

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tabla 11 Comparaciones por parejas de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Atracina-sp	18	0.393333	A
Atracina-p	18	0.269444	A
Atracina-f	18	0.173333	A
Metamidophos-f	18	-0.103333	A
Metamidophos-sp	27	-0.200370	A
Metamidophos-f	9	-0.285556	A
Metamidophos-p	10	-0.356448	A
Metamidophos-p	9	-0.504444	A

Para este análisis se tomó como referencia la repetición 2 y 3, en donde al ser analizados en conjunto (Table 11) resultó que las medias de ambos al compartir la misma letra (A) pertenecen a un mismo grupo y no existe diferencia estadísticamente significativa para ninguno de los casos. Por lo que se puede afirmar que la biodegradación de Atrazina y Methamidophos se puede dar realizar con cualquiera de las *Pseudomonas* estudiadas.

## b. Discusiones

En Trujillo, Padilla *et al.*, (2014) realizó una investigación respecto al uso de fertilizantes y plaguicidas en donde se indica que el 47% de agricultores de la zona realizan de 3 a 4 aplicaciones por campaña y el 38% de 1 a 2 aplicaciones de pesticidas. Estos datos guardan relación con el estudio que se realizó ya que en la región Ancash también se suele utilizar a los plaguicidas Atrazina y Methamidophos en los cultivos.

Según Chitiva y Dusan, 2003, *Pseudomonas sp.* crecen en medios simples. En caldo crecen abundantemente formando un anillo y un sedimento de color verde azulado. En agar simple suele formar colonias brillantes, confluentes, de borde continuo y en ocasiones con borde ondulado con un centro opaco. El pigmento (piocianina) se propaga en el medio dándole una tonalidad azul verdosa. Este pigmento tiene cualidades

bactericidas sobre otras bacterias Gram positivas y Gram negativas. En la investigación se pudo observar que el medio inicialmente color amarillo debido al caldo LB se tornó color verdoso, y en los que se encontraban los plaguicidas los cardos inicialmente fueron de color blanquecino y con el paso del tiempo se tornaron del color característico verde azulado lo cual nos indica el crecimiento de las *Pseudomonas*.

En la investigación se utilizó como biodegradantes a *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas Fluorescente*, las cuales demostraron un resultado favorable a la biodegradación de Atrazina y Methamidophos. Zhang *et al.* (2005 citado por Mendoza y Guerrero 2015) sostiene que la familia *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos con mayor diversidad metabólica, la cual ha sido sostenida por numerosos trabajos, en donde se emplearon diferentes sustratos como fuente de carbono y energía. En esta investigación los plaguicidas cumplieron el rol de fuentes de carbono y energía en la ruta metabólica de estas logando de esta forma la biodegradación de Atrazina y Methamidophos.

La Atrazina puede ser degradada por cepas de *Pseudomonas sp.* aisladas de sitios contaminados por herbicidas. En el campo del control biológico en plantas, la aplicación de *Pseudomonas fluorescens* proporciona una de las estrategias más usadas, algunas cepas actúan como promotoras del crecimiento de plantas, o PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) por suspensión de patógenos, por incremento de la absorción de minerales por la planta o por secreción de fitohormonas y vitaminas (Alanis & Guerrero 2004). Los autores C *et al.*, 2001, indican que la degradación microbiana produce una simplificación de los compuestos de los plaguicidas obteniendo de esa forma compuestos más simples y menos tóxicos. Las cepas con las que se trabajan fueron previamente aisladas de ambientes hospitalarios industriales tanto de la Universidad Nacional del Santa y la Universidad Pedro Ruiz Gallo.

*Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas putida.* de aguas con residuos de hidrocarburos y *pseudomonas fluorecents* de agua residual proveniente de industrias; pese a ello ambas tuvieron resultados satisfactorios debido a su resistencia y adaptabilidad en ambientes tóxicos. Shapir *et al.*, (2007) refiere que la atrazina es utilizada preferentemente por los microorganismos como fuente de nitrógeno debido al estado totalmente oxidado de los carbonos del anillo s-triazina, estas cadenas laterales también pueden utilizarse como

fuelle de carbono. En una investigación realizada por Esteban en 2016 respecto al comportamiento de Atrazina y su relación con la práctica de fertilización nitrogenada en el suelo indica que los descensos de concentraciones de Atrazina en la capa superficial del suelo pudieron deberse a la degradación biológica, por microorganismos autóctonos presentes.

Jaramillo *et. al.* 2016 resalta que, en cuanto a la velocidad de descomposición y desaparición de los compuestos organofosforados, carbamatos y otros, es sólo relativa, ya que algunos factores como la propia estructura química del compuesto, tipo de suelo, contenido en materia orgánica, contenido y naturaleza de los minerales de la arcilla presentes en el suelo, composición granulométrica, pH, humedad y temperatura pueden influir decisivamente en el grado de persistencia. En el estudio se empleó el medio líquido y aunque todos tuvieron la misma formulación no se encontró alguna diferencia significativa para en la velocidad de descomposición, siendo todos los tratamientos estadísticamente iguales.

## VI. CONCLUSIONES

Llevado a cabo la investigación en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa se concluye en lo siguiente:

- Se demostró la biodegradación de Atrazina y Methamidophos por *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* en condiciones de laboratorio. La biodegradación se observó por el cambio de color en los matraces, estos pasaron de color blanquecino a color verde azulado por lo que se concluye que estos plaguicidas no son tóxicos para las *Pseudomonas* en estudio, sino por el contrario estas toman los componentes como fuente de nutrientes lo que permite que estas puedan crecer y desarrollarse. Este cambio de color observado se llegó a cuantificar midiendo la absorbancia de cada una de las muestras tomadas, con la ayuda de un espectrofotómetro, lo que nos brindó los resultados antes mencionados.
- Se comparó la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* en condiciones de

laboratorio. Dando como resultado que no existe una diferencia estadísticamente significativa en relación a la biodegradación de estas tres especies de *Pseudomonas*. Para los fines de biodegradación de los plaguicidas en estudio se podría utilizar este género de bacterias las cuales demuestran su alta capacidad biodegradadora. Aunque analizando los factores de costo, sería conveniente usar la *Pseudomonas sp*, puesto que no hay necesidad de caracterizarla esta especie, lo que llevaría a un ahorro para las futuras investigaciones puesto que conociendo el género se puede afirmar que sí se dará la biodegradación de plaguicidas.

## VII. RECOMENDACIONES

Como recomendaciones consideramos que:

- Se recomienda tener todas las medidas de protección para el trabajo con plaguicidas puesto que ellos pueden llegar a ser altamente tóxicos si no se tiene el cuidado adecuado.
- Tener en cuenta que las muestras que no serán analizadas el mismo día deben de ser refrigeradas para poder detener el crecimiento microbiano, de esa forma poder tener resultados más confiables.
- Es posible poder hacer un análisis más exacto de los plaguicidas degradados y las moléculas que se desprenden dela degradación usando equipos de mayor precisión para eliminar el ruido y conseguir gráficas con mayor exactitud.
- Se debe seguir investigando otros factores que no fueron cubiertos en esta investigación por las delimitaciones del objeto de estudio. Por ejemplo alguno de los factores que pueden ser analizados son: medir la biomasa, determinar la presencia metabolitos secundarios, determinar parámetros óptimos de factores ambientales que podrían ser necesarios para estandarizar y tener resultados para poder ser escalados.

## VIII. Referencias bibliográficas

- Athanasopoulos, P. E., Pappas, C., Kyriakidis, N. V., & Thanos, A. (2005). Degradation of methamidophos on soultanina grapes on the vines and during refrigerated storage. *Food Chemistry*, *91*(2), 235-240. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.10.018
- Atterby H., Smith N., Chaudhry Q. y Stead D. (2002). Explotación de microbios y plantas para limpiar entornos contaminados con plaguicidas. *Perspectiva de plaguicidas*.
- ATSDR. (2013, septiembre). Public Health Statement for Atrazine. Recuperado 21 de julio de 2018, de Agency for Toxic Substances & Disease Registry website: <https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=336&tid=59>
- Authority, A. P. and V. M. (2014, mayo 30). Methamidophos Chemical Review [Text]. Recuperado 21 de julio de 2018, de Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority website: <https://apvma.gov.au/node/12601>
- Andriulo, A., Sasal, C., & Portela, S. (2004). Impacto Ambiental de la Agricultura Pampeana. IDIA XXI. Buenos Aires.
- Bansal, O. P. (2012, abril 11). Degradation of Pesticides. doi: 10.1201/b11864-7
- Bedmar, F. (2011). *¿Qué son los plaguicidas?* 27.
- C, L. E. P., Yunda, A. L. de, & Fuentes', C. L. (2001). Mineralización de <sup>14</sup>C Atrazina en tres suelos de Colombia. *Revista Colombiana de Química*, *30*(1), 27-36. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/22281>
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, *6*(2), 48-60. doi: 10.1002/fes3.108

- Campos, C., & Palacios, A. (2010). *Determinación por HPLC de residuos de insecticida organofosforado (Methamidophos) en tomates comercializados en Lima-Perú*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Castellanos, J., Cardenal, R., & Yanira, L. (2013). Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas N-Metilcarbamatos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 105-119.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S. et al. (2005). Utilización de la sinergia entre plantas y microorganismos de la rizosfera para mejorar la degradación de contaminantes orgánicos en el medio ambiente. *Env Sci Poll Res Int* 12, 34-48. <https://doi.org/10.1065/espr2004.08.213>.
- Christiansen, A., Gervais, J., Buhl, K., & Stone, D. (2011). *Acephate Technical Fact Sheet*. Obtenido de National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/acephatech.html>
- Consejo de Salubridad General. (2011). Prevención primaria, diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de la intoxicación aguda por agroquímicos en el primer nivel de atención. *Guía Práctica Clínica*, 50.
- Cruz Escalon, A. (2017). Situación actual del consumo de pesticidas en el Perú. *Universidad Nacional Agraria La Molina*. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2976>
- D Baylis, A. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: Strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, 56, 299-308. doi: 10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<299::AID-PS144>3.0.CO;2-K

- EPA. (2002, agosto). Methamidophos IRED Facts | Pesticides | US EPA. Recuperado 21 de julio de 2018, de Environmental Protection Agency website: [https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/methamidophos\\_ired\\_fs.html](https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/methamidophos_ired_fs.html)
- Esteban, R. (2016). *Comportamiento de atrazina y su relación con la practica de fertilización nitrogenada en un suelo de la pedanía cañas, departamento colón, provincia de córdoba*. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Cordoba.
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26, 155-171. Recuperado de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1137-66272003000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1137-66272003000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- FAO. (2003). Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. *Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.*, 40.
- Foster, R., John, L., Kwan, B. H., & Vancov, T. (2004). Microbial degradation of the organophosphate pesticide, Ethion. *FEMS Microbiology Letters*, 240(1), 49-53. doi: 10.1016/j.femsle.2004.09.010
- Gilani, R. A., Rafique, M., Rehman, A., Munis, M. F. H., Rehman, S. ur, & Chaudhary, H. J. (2016). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus Pseudomonas. *Journal of Basic Microbiology*, 56(2), 105-119. doi: 10.1002/jobm.201500336
- Guillén Garcés, R. A., Hansen, A. M., & van Afferden, M. (2007). Mineralization of atrazine in agricultural soil: Inhibition by nitrogen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(5), 844-850.
- Hansen, A. M., Quintanilla, L. G. T., Pacheco, H. M., Canela, M. V., Márquez, L. C. G., Garcés, R. A. G., & Antonio, A. H. (2013). ATRAZINA: UN HERBICIDA

POLÉMICO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(0), 65-84.

Recuperado de

<http://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/41420>

Huang, J., Zhou, K., Zhang, W., Deng, X., Werf, W. van der, Lu, Y., ... Rosegrant, M.

W. (2018). Uncovering the economic value of natural enemies and true costs of chemical insecticides to cotton farmers in China. *Environmental Research Letters*, 13(6), 064027. doi: 10.1088/1748-9326/aabfb0

Jaiswal, D. K., Verma, J. P., & Yadav, J. (2017). Microbe Induced Degradation of

Pesticides in Agricultural Soils. En *Ciencia e Ingeniería Ambiental. Microbe-Induced Degradation of Pesticides* (pp. 167-189). doi: 10.1007/978-3-319-45156-5\_8

Kiss, A., & Virág, D. (2009). Photostability and Photodegradation Pathways of

Distinctive Pesticides. *Journal of Environmental Quality*, 38(1), 157-163. doi: 10.2134/jeq2007.0504

Lhomme, L., Brosillon, S., & Wolbert, D. (2008). Photocatalytic degradation of

pesticides in pure water and a commercial agricultural solution on TiO<sub>2</sub> coated media. *Chemosphere*, 70(3), 381-386. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.07.004.

Mendoza, J., Perea, Y., Salvador, J., Morales, J., & Pérez, G. (2011). Biodegradación

bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 45-55.

Navarro, S., & Barba, A. (s.f.). *Dialnet*. Recuperado el 01 de 12 de 2019, de

Comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=145040>.

N Kanade, S., Ade, A., & Khilare, V. (2012). *Malathion Degradation by Azospirillum*

*lipoferum Beijerinck*. 2(1): 94-103.

- Nwani, C. D., Lakra, W. S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., & Srivastava, S. K. (2010). Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(8), 3298-3312. doi: 10.3390/ijerph7083298
- Ortiz-Monasterio, I., D.Sayre, K., & Rajaram, S. (1997). *Progreso genético en el rendimiento del trigo y la eficiencia de nitrógeno bajo cuatro tasas de nitrógeno*. Ciencias de los cultivos.
- Ostrofsky, E. B., Robinson, J. B., Traina, S. J., & Tuovinen, O. H. (2002). Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(10), 1449-1459. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00089-5
- Padilla, A. G., Florián, J. F., & Guerrero, J. F. (2014). Uso de fertilizantes y plaguicidas en el distrito de Poroto, Trujillo-La Libertad, 2013. *SCIENDO*, 16(1). Recuperado de <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/view/634>
- Rodríguez, D. C., López, B., Peñuela, G. A., & Agudelo, S. (2009). EVALUATION OF DEGRADATION AND MINERALIZATION OF THE MALATHION USING PHOTOCATALYSIS WITH A SOLAR COLLECTOR. *Revista Colombiana de Química*, 38(2), 221-234. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-28042009000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-28042009000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=es).
- Rojas, R. (2016). *Desarrollo de Métodos para la reducción de la contaminación por plaguicidas en agua subteraneas mediante la adición de residuos orgánicos a los suelos*. España: Universidad de Sevilla.

- Sarkar, S., Subbiah, S., & Premkumar, R. (2009). Biodegradation of propargite by *Pseudomonas putida*, isolated from tea rhizosphere. *Journal of hazardous materials*, 174, 295-298. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.09.050
- Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., & Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927-948. doi: 10.1128/CMR.00044-14
- Uhart, S., & Echevarria, H. (1995). El rol del nitrógeno en la producción del cultivo de maíz. Diagnóstico de la fertilización nitrogenada. *Fertilizar*, 6, 27-35.
- Vargas, J. M. (1975). PESTICIDE DEGRADATION. *J. Arboriculture*, 1(12):232-233.
- Velmurugan, G., Ramprasath, T., Swaminathan, K., Mithieux, G., Rajendhran, J., Dhivakar, M., ... Ramasamy, S. (2017). Gut microbial degradation of organophosphate insecticides-induces glucose intolerance via gluconeogenesis. *Genome Biology*, 18(1), 8. doi: 10.1186/s13059-016-1134-6
- Wang, M.-C., Liu, Y.-H., Wang, Q., Gong, M., Hua, X.-M., Pang, Y.-J., ... Yang, Y.-H. (2008). Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 778-788. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.10.012
- Yadav, I., & Devi, N. (2017). *Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment*.

## VIII. Anexos

### Anexo 1 Diagrama de Metodología del proceso de biodegradación de Atrazina y Methamidophos.

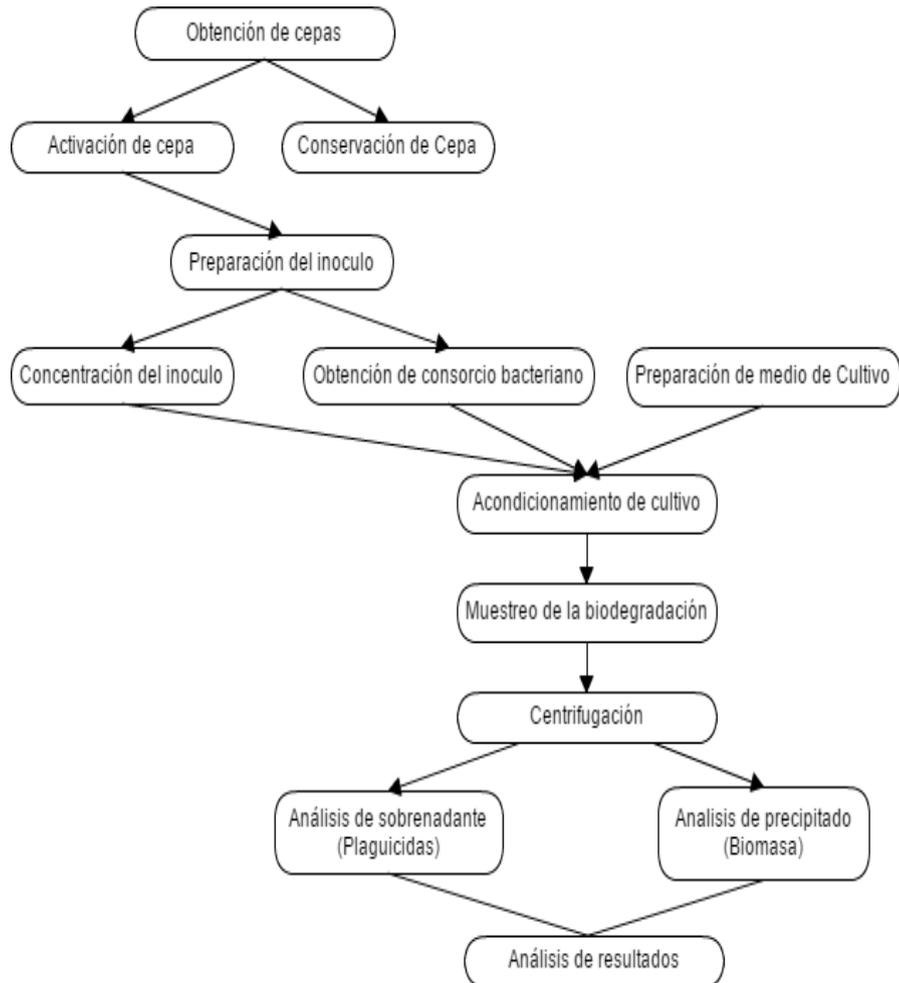


Figura 10 Diagrama de metodología de estudio

**Anexo 2 Registro fotográfico del procedimiento de biodegradación de Atrazina y Methamidophos por *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens***

- **Preparación de inóculos de *Pseudomonas***



Figura 11 Mantenimiento, cultivo continuo de las cepas *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*.

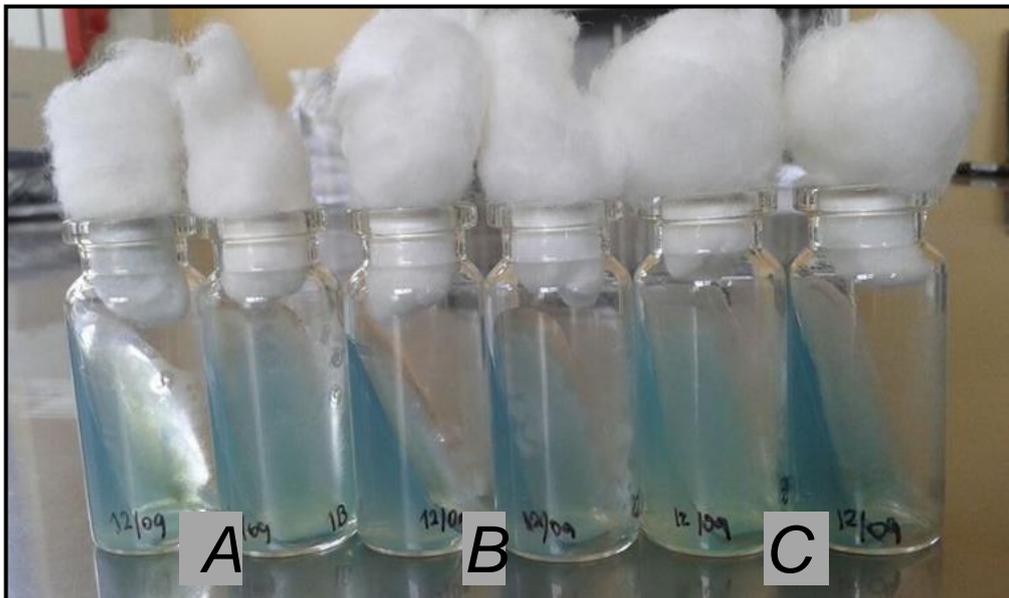


Figura 12. Crecimiento de A) *Pseudomonas sp*, B) *Pseudomonas putida* y C) *Pseudomonas fluorescens* en agar nutritivo.



Figura 13. Obtención de inóculo concentrado de *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* en solución salina para las diluciones.



Figura 14. Escala de McFarland referencia para las suspensiones de *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* en solución salina fisiológica a una concentración de  $3 \times 10^8$ .



Figura 15. Inoculación 1ml de *Pseudomona sp* a una concentración bacteriana de  $3 \times 10^8$  bacterias/mL, a los matraces respectivos.

- **Sistema para ATRAZINA:**



A) *Inicio de Sistema*



B) *Fin de Sistema*

Figura 16. Sistema de biodegradación del plaguicida atracina por las bacterias *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* en cada matraz, A) En la figura se muestra en el tiempo 0 (inicio del sistema) y B) transcurrido 15 días (fin del sistema) de biodegradación.

- **Sistema Para Methamidophos:**



Figura 17. Sistema de biodegradación del plaguicida methamidophos por las bacterias *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* en cada matraz, en la figura se muestra A) tiempo 0 (inicio del sistema) y transcurrido 15 días (B), (fin del sistema) de biodegradación.



Figura 18. Muestreo: A) Toma de muestra del sistema (Plaguicida+ inoculo+ caldo LB) B) Deposito de la muestra a ser evaluada en tubos. C) Tubo conteniendo la muestra a evaluar.



Figura 19. Stock de muestras colectadas en tiempos determinados que se conservaron a - 80 °C.

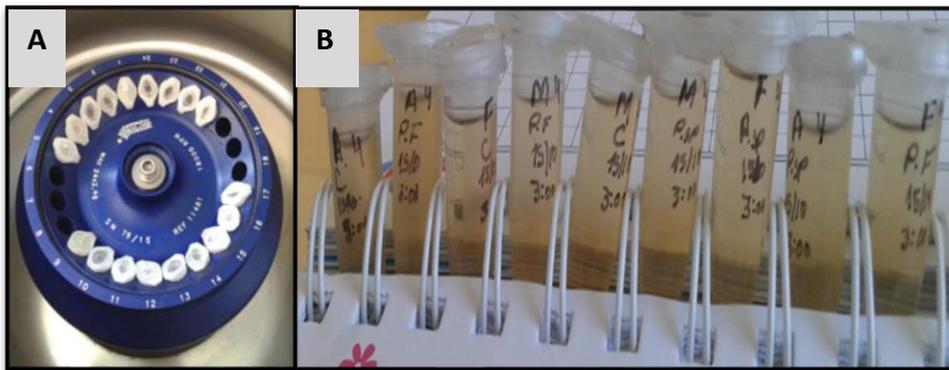


Figura 20. Procesamiento de las muestras a analizar: A) Ubicación de las muestras para ser centrifugadas. B) Muestras centrifugadas.



Figura 21. Análisis del sobrenadante. Para una adecuada lectura de las muestras se realizó una dilución de 1/10 por cada muestra.

### Anexo 3 Realización de curvas de calibrado

Se procedió a realizar una curva de calibrado para cada uno de los plaguicidas en estudio, lo cual nos permitió determinar la biodegradación con las pseudomonas.

Tabla 12 Calibración de Mathamidophos

Mathamidophos	
Concentración gr/L	Absorbancia
0	0
0.437	2
0.334	1.5
0.141	1
0.15	0.5

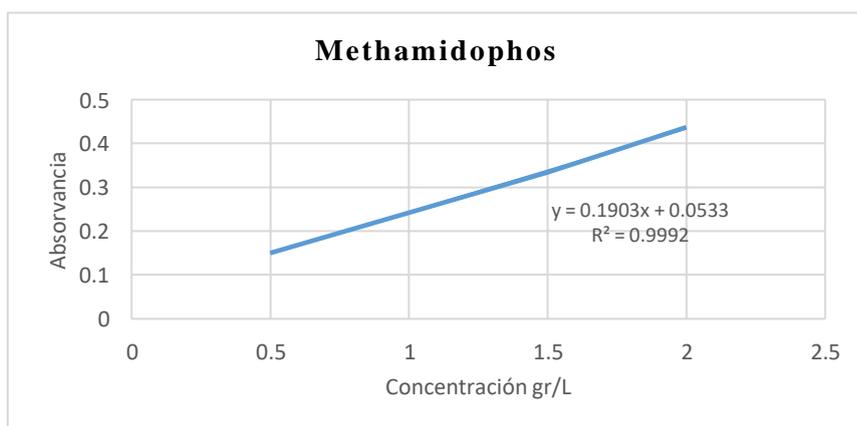


Figura 22 Curva de calibrado de Methamidophos

Tabla 13 Calibración de Atrazina

Atrazina	
Concentración gr/L	Absorbancia
8	3.517
7	3.442
6	3.365
5	3.160
4	3.179
3	2.976
2	2.772
1	2.732
0.5	0.723

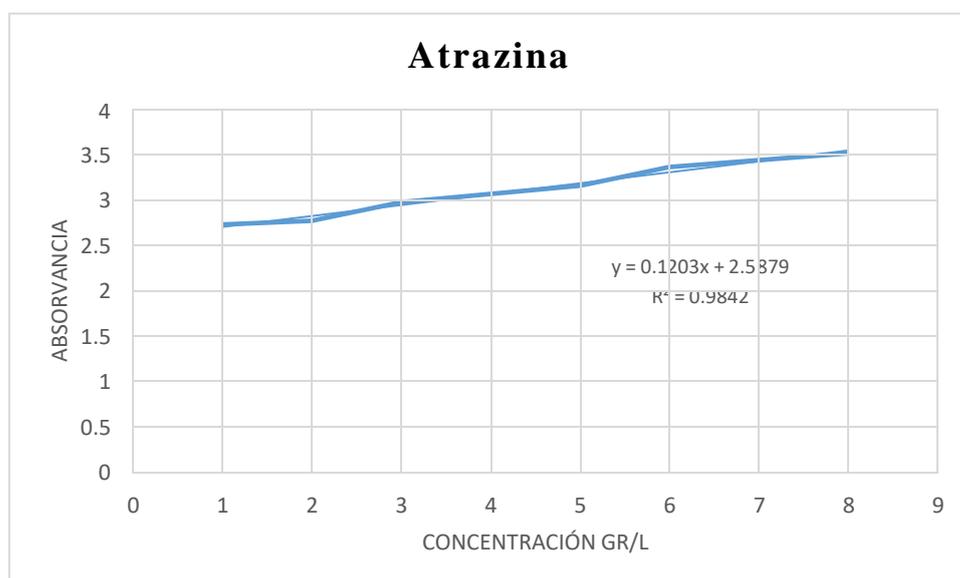


Figura 23 Curva de calibrado de Atrazina

#### Anexo 4 Determinación de Normalidad en las 3 Repeticiones (épocas)

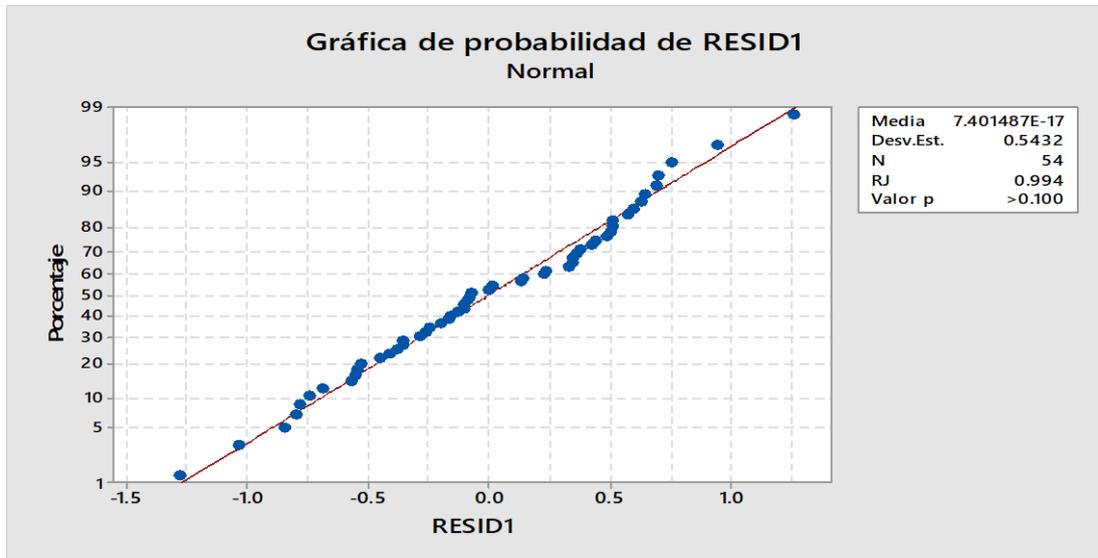


Figura 24 Grafica de distribución normal para la primera repetición

Para la primera repetición con un  $p > 0.1000$  se concluye que tiene una distribución normal

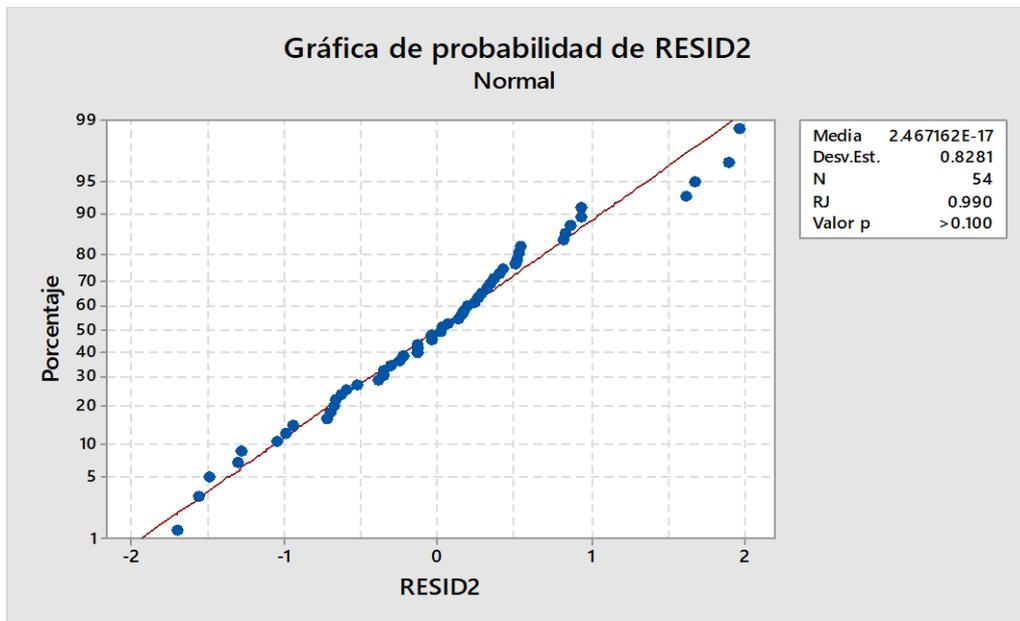


Figura 25 Grafica de distribución normal para la segunda repetición

Para la segunda repetición con un  $p > 0.1000$  se concluye que tiene una distribución normal.

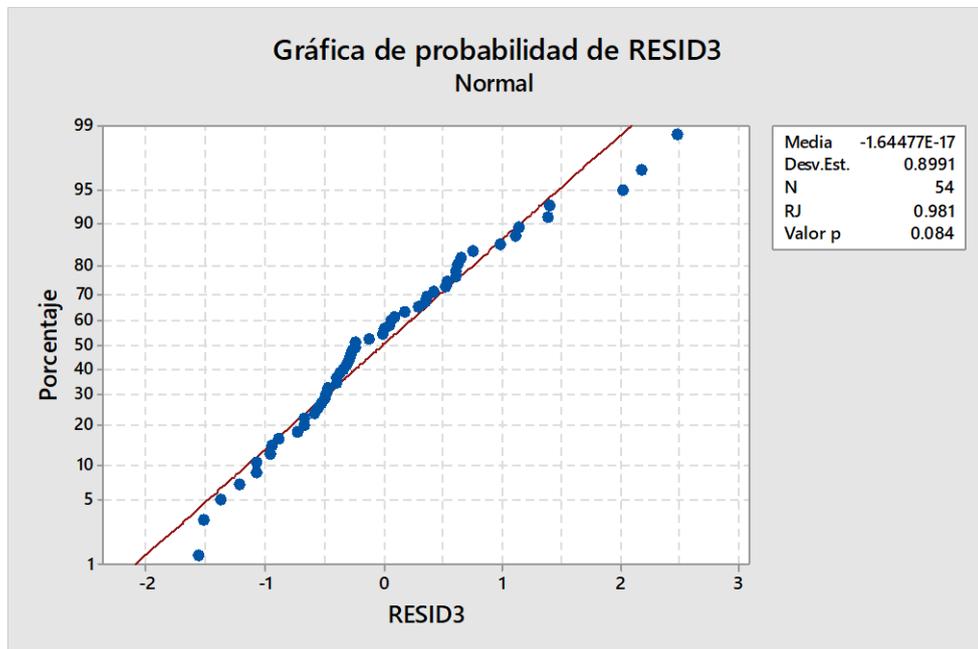


Figura 26 Grafica de distribución normal para la tercera repetición

Para la tercera repetición con un  $p=0.084$  se concluye que tiene una distribución normal.

La distribución normal se aplicó en todas las repeticiones con todo el tratamiento, esto para poder determinar la biodegradación de Atrazina y Methamidophos usando las *Pseudomonas* y determinando cuál de ellas es el mejor tratamiento.

## Anexo 5 Análisis estadístico

Se trabajó con un modelo estadístico BDCA con análisis combinados con tres repeticiones, en donde los bloques fueron tomados de acuerdo al crecimiento microbiano (fase de latencia, fase exponencial y fase estacionaria) . Se realizó la prueba paramétrica de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad en los datos. El programa InfoStat se utilizó para transformar los datos obtenidos en el experimento y luego estos fueron procesados en el programa Minitab.

Tabla 14 Diseño del sistema matriz

	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>
Atrazina			
Methamidophos			

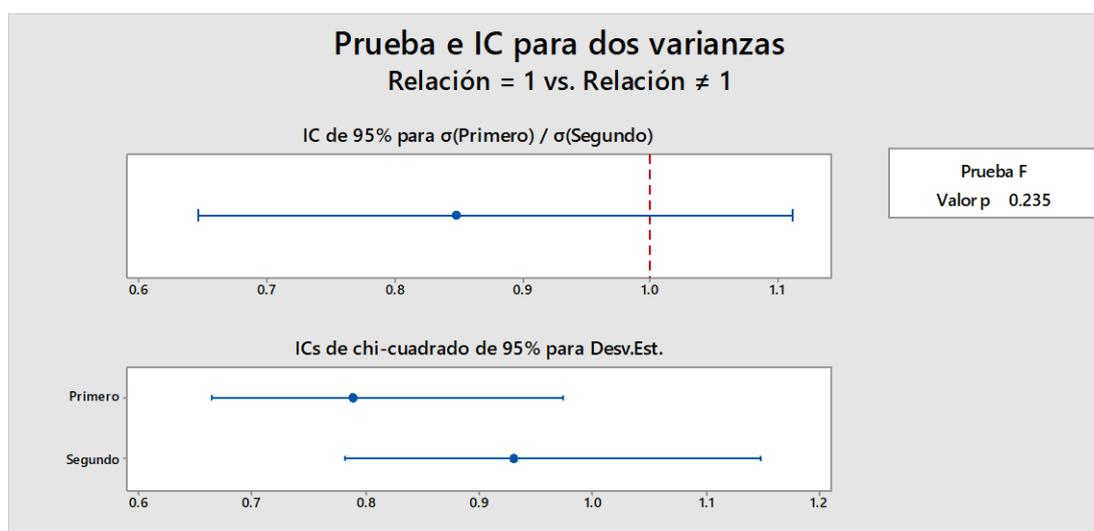


Figura 27 Prueba de Índice de Correlación (IC) para dos varianzas

Para realizar la prueba Fisher comparando las dos varianzas se analizaron los resultados de las repeticiones 2 y 3 puesto que en ellas se encontró una diferencia estadística significativa en los tratamientos. Con esta prueba se corrobora que como el  $p=0.235$ , mayor que el  $\alpha= 0.05$  se acepta  $H_p$ , por lo tanto, los experimentos evaluados en las dos repeticiones presentan la misma variabilidad.