



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



TOLERANCIA *IN VITRO* A DOS INSECTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS DE BACTERIAS AISLADAS DE TRES  
CAMPOS DE CULTIVO DEL DISTRITO DE PUNO

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

**Br. JOEL CRHISTIAN MAMANI QUENALLATA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO - PERÚ**

**2020**



## DEDICATORIA

A Nuestro Señor Dios, por haberme dado la vida, salud, sabiduría y fortaleza en los momentos de debilidad, para seguir siempre adelante con el fin de lograr mis objetivos y metas trazadas, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

A mi querida madre Lurdes Quenallata Mamani, pilar fundamental en mi vida, por confiar siempre en mí y nunca dudar en apoyarme para que no desista de mis estudios, con mucho amor y cariño, le dedico todo mi esfuerzo en reconocimiento a todo el sacrificio que hizo para que pueda estudiar, se merece esto y mucho más. Mi eterno agradecimiento, gracias por todo.

A mi querido padre Eleodoro Mamani Sacaca, sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer en esta vida de lucha y superación constante, deseo expresarles que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos y constituye el legado más grande que pudiera recibir. Con cariño, admiración y respeto. Gracias.

A mis hermanos Alex y Leydi por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

*Joel Christian Mamani Quenallata*



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas y docentes que inculcaron en mi formación profesional.

De manera muy especial, a mis queridos padres que me brindaron su apoyo en todo momento para la culminación exitosa de mis estudios superiores.

Al Dr. Juan José Pauro Roque, por su dirección, asesoría, amistad y apoyo incondicional durante el desarrollo de la presente Tesis.

Al jurado conformado por los docentes, Dr. Edmundo Gerardo Moreno Terrazas Dr. Nicanor Miguel Bravo Choque y Mg. María Isabel Vallenás Gaona, por sus sugerencias y revisión del Informe Final de Tesis.

A mis amigos y amigas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, de manera especial a Ricardo, Grethy, Hector, Zully, Julio, Franz y Frank, por haber hecho de mi vida universitaria una travesía de experiencias y anécdotas que nunca las olvidaré. Y para terminar agradecer a toda mi familia, por su apoyo incondicional. Mis más sinceros agradecimientos.

*Joel Christian Mamani Zuenallata*



## ÍNDICE GENERAL

|   |           |
|---|-----------|
| <b>DEDICATORIA</b>  |           |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>  |           |
| <b>ÍNDICE GENERAL</b>   |           |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>  |           |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>   |           |
| <b>ÍNDICE DE ACRÓNIMOS</b>  |           |
| <b>RESUMEN .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>CAPÍTULO I</b>   |           |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   |           |
| <b>1.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>CAPÍTULO II</b>  |           |
| <b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>   |           |
| <b>2.1 ANTECEDENTES .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>2.2 MARCO TEÓRICO.....</b>   | <b>21</b> |
| 2.2.1 Suelo y sus características.....  | 21        |
| 2.2.2 Bacterias en suelos .....   | 23        |
| 2.2.3 Insecticidas organofosforados.....  | 24        |
| 2.2.4 Efectos de los insecticidas organofosforados en el medio ambiente .....   | 28        |
| 2.2.5 Tolerancia bacteriana a insecticidas.....   | 30        |
| 2.2.6 Biorremediación bacteriana de insecticidas .....  | 32        |
| 2.2.7 Genética en la biorremediación de insecticidas .....  | 34        |
| <b>CAPÍTULO III</b>   |           |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>   |           |
| <b>3.1 ZONA DE ESTUDIO.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>3.2 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE SUELOS DE<br/>TRES CAMPOS DE CULTIVO DE LAS LOCALIDADES DE ICHU,<br/>JAYLLIHUAYA Y HUERTA HUARAYA .....</b> | <b>38</b> |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.5 DETERMINACIÓN DE LA TOLERANCIA BACTERIANA A LOS<br/>INSECTICIDAS MATADOR Y TAMARON EN TRES<br/>CONCENTRACIONES .....</b> | <b>41</b> |
| <b>CAPÍTULO IV<br/>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   |           |
| <b>4.1 CARGA BACTERIANA DE SUELOS DE LAS LOCALIDADES DE ICHU,<br/>JAYLLIHUAYA Y HUERTA HUARAYA .....</b>                        | <b>46</b> |
| <b>4.2 TOLERANCIA A LOS INSECTICIDAS MATADOR Y TAMARON EN<br/>BACTERIAS.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>67</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>82</b> |

**Área:** Ciencias Biomédicas

**Tema:** Biotecnología Microbiana

**Fecha de sustentación:** 11 de diciembre 2020.



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Zonas de muestreo de suelo ubicadas en el distrito de Puno. ....   | 36 |
| <b>Figura 2.</b> Croquis de colección de muestras de tierra (M1 y M2) en campos de cultivo de papa en tres localidades del distrito de Puno. ....                     | 38 |
| <b>Figura 3.</b> Esquema de preparación de diluciones de muestras de tierra colectadas de tres campos de cultivo en localidades del distrito de Puno.....             | 39 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema de cultivo en placas de APC de diluciones de muestras de tierra colectadas de tres campos de cultivo en localidades del distrito de Puno. .. | 40 |
| <b>Figura 5.</b> Promedio de recuentos bacterianos en suelos de tres localidades de muestreo, agosto y noviembre 2019. ....   | 47 |
| <b>Figura 6.</b> Promedios de recuentos de colonias de <i>Pseudomonas</i> sp frente a tres concentraciones del insecticida Matador. ....                              | 55 |
| <b>Figura 7.</b> Promedios de recuentos de colonias de <i>Bacillus</i> sp frente a tres concentraciones del insecticida Matador. ....                                 | 55 |
| <b>Figura 8.</b> Promedios de recuentos de colonias de <i>Serratia</i> sp frente a tres concentraciones del insecticida Matador. ....                                 | 56 |
| <b>Figura 9.</b> Promedios de recuentos de colonias de <i>Pseudomonas</i> sp frente a tres concentraciones del insecticida Tamaron. ....                              | 58 |
| <b>Figura 10.</b> Promedios de recuentos de colonias de <i>Bacillus</i> sp frente a tres concentraciones del insecticida Tamaron. ....                                | 59 |
| <b>Figura 11.</b> Promedios de recuentos de colonias de <i>Serratia</i> sp frente a tres concentraciones del insecticida Tamaron. ....                                | 59 |
| <b>Figura 12.</b> Muestreo de tierra en tres localidades. ....  | 82 |
| <b>Figura 13.</b> Procedimiento para el recuento bacteriano en muestras de tierra en tres localidades.....  | 82 |
| <b>Figura 14.</b> Uso de materiales y equipos en el proceso de recuento bacteriano en muestras de tierra en tres localidades.....                                     | 83 |
| <b>Figura 15.</b> Preparación de diluciones y cultivo en agar APC para el recuento bacteriano en muestras de tierra en tres localidades. ....                         | 83 |
| <b>Figura 16.</b> Recuentos de colonias bacterianas en muestras de tierra de tres localidades. ....   | 83 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 17.</b> Coloración Gram y observación de bacterias al microscopio óptico compuesto (1000X).....   | 84 |
| <b>Figura 18.</b> Preparación de medios, esterilización y cultivos bacterianos para identificación bacteriana. ....   | 84 |
| <b>Figura 19.</b> Cultivos puros de bacterias aisladas, pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CS e Indol) y prueba de la oxidasa para identificación bacteriana.....   | 84 |
| <b>Figura 20.</b> Preparación de soluciones de insecticidas a diferentes concentraciones. ....  | 85 |
| <b>Figura 21.</b> Cultivo de bacterias en agar Plate Count con diferentes concentraciones de insecticidas Matador y Tamaron.....  | 85 |
| <b>Figura 22.</b> Recuento de colonias bacterianas en agar Plate Count a diferentes concentraciones.....  | 85 |
| <b>Figura 23.</b> Prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos para comparar los recuentos bacterianos en suelos de tres localidades, agosto a octubre 2019.....   | 86 |
| <b>Figura 24.</b> Prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencia estadística de los recuentos bacterianos según meses de muestreo, agosto a octubre 2019. ...  | 86 |
| <b>Figura 25.</b> Prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencia estadística de los recuentos de colonias de <i>Pseudomonas</i> frente a tres concentraciones de Matador, agosto a octubre 2019..... | 86 |
| <b>Figura 26.</b> Prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencia estadística de los recuentos de colonias de <i>Bacillus</i> frente a tres concentraciones de Matador, agosto a octubre 2019. ....   | 86 |
| <b>Figura 27.</b> Prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencia estadística de los recuentos de colonias de <i>Serratia</i> frente a tres concentraciones de Matador, agosto a octubre 2019. ....   | 86 |
| <b>Figura 28.</b> Prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencia estadística de los recuentos de colonias de <i>Pseudomonas</i> frente a tres concentraciones de Tamaron, agosto a octubre 2019..... | 87 |
| <b>Figura 29.</b> Prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencia estadística de los recuentos de colonias de <i>Bacillus</i> frente a tres concentraciones de Tamaron, agosto a octubre 2019.....    | 87 |
| <b>Figura 30.</b> Prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencia estadística de los recuentos de colonias de <i>Serratia</i> frente a tres concentraciones de Tamaron, agosto a octubre 2019.....    | 87 |
| <b>Figura 31.</b> Fotografías de los insecticidas adquiridos en una tienda agropecuaria de la   |    |



|   |    |
|---|----|
| ciudad de Juliaca, para los experimentos de la investigación.....                     | 87 |
| <b>Figura 32.</b> Diagrama de flujo de la investigación realizada para la tesis. .... | 88 |





## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Propiedades del insecticida Tamaron (indicaciones del fabricante).....  | 27 |
| <b>Tabla 2.</b> Propiedades del insecticida Matador (indicaciones del fabricante).....  | 28 |
| <b>Tabla 3.</b> Distribución de muestras por zonas y meses de muestreo.....   | 37 |
| <b>Tabla 4.</b> Características bioquímicas de colonias bacterianas para la identificación de la especie <i>Pseudomonas</i> sp (Corrales <i>et al.</i> 2014)..... | 43 |
| <b>Tabla 5.</b> Características bioquímicas de colonias bacterianas para la identificación de la especie <i>Bacillus</i> sp (Márquez, 2007). ....                 | 43 |
| <b>Tabla 6.</b> Características bioquímicas de colonias bacterianas para la identificación de la especie <i>Serratia</i> sp (Corrales <i>et al.</i> 2014).....    | 43 |
| <b>Tabla 7.</b> Recuentos bacterianos ( $\times 10^3$ UFC/g) en campos de cultivo de tres localidades del distrito de Puno, agosto a octubre 2019. ....           | 47 |
| <b>Tabla 8.</b> Recuento de colonias bacterianas (UFC) expuestas al insecticida Matador, agosto a octubre 2019. ....  | 54 |
| <b>Tabla 9.</b> Recuento de colonias bacterianas (UFC) expuestas al insecticida Tamaron, agosto a octubre 2019. ....  | 57 |



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- ADN: ácido desoxirribonucleico  
APC: agar Plate Count  
CS: citrato Simmons  
CV: coeficiente de variabilidad  
gl: grados de libertad  
H: valor H de Kruskal Wallis  
LIA: agar lisina hierro  
P: probabilidad  
Prom: promedio  
TSI: triple azúcar hierro  
UFC/g: unidades formadoras de colonia por gramo



## RESUMEN

La investigación se realizó en el laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno - Perú, durante Agosto – Noviembre del 2019. La excesiva aplicación de insecticidas en los campos de cultivo de papa de la región, traen consigo la erosión de los suelos, ante ellos existirían bacterias capaces de tolerar y posteriormente degradar a los insecticidas, motivo de la investigación. Los objetivos fueron: a) cuantificar la carga bacteriana de suelos de tres campos de cultivo de las localidades de Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya y b) determinar la tolerancia a los insecticidas Matador y Tamaron en tres concentraciones de las bacterias previamente aisladas. La metodología consistió en primer lugar en cuantificar la carga total bacteriana total en muestras de suelo de tres localidades del distrito de Puno, a partir de ellos se lograron cultivos puros de los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia*. Las muestras fueron un total de seis de cada localidad de muestreo (Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya), y fueron colectadas al azar. En segundo lugar, los géneros bacterianos fueron cultivados en medios de cultivos con agar APC suplementados con tres concentraciones de los tóxicos (2%, 3% y 6%), donde se contabilizaron el número de colonias de cada bacteria en cada tratamiento. Los resultados fueron: en Ichu, los recuentos fueron de 51 UFC/g y 98 UFC/g, en Jayllihuaya de 82 UFC/g y 93 UFC/g y en Huerta Huaraya de 271 UFC/g y 289 UFC/g; la tolerancia fue mayor en bacterias del género *Bacillus* sp. Se concluye que los suelos del distrito de Puno, poseen recuentos medios de carga bacteriana edáfica y las bacterias aisladas son capaces de tolerar concentraciones de 6% de insecticida, siendo mejor las bacterias de los géneros *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp.

**Palabras clave:** Bacterias, insecticidas, suelos, tolerancia.



## ABSTRACT

The research was carried out in the Laboratory of Botany and Biotechnology of the Faculty of Biological Sciences of the National University of the Altiplano de Puno - Peru, during August - November 2019. The excessive application of insecticides in the potato fields of the region, they bring with them the erosion of the soils, before them there would be bacteria capable of tolerating and later degrading the insecticides, reason for the investigation. The objectives were: a) to quantify the bacterial load of soils of three fields of cultivation of the localities of Ichu, Jayllihuaya and Huerta Huaraya and b) to determine the tolerance to the insecticides Matador and Tamaron in three concentrations of the previously isolated bacteria. The methodology consisted in the first place in quantifying the total bacterial load in soil samples from three localities of the district of Puno, from them pure cultures of the bacterial genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Serratia* were obtained. The samples were a total of six from each sampling location (Ichu, Jayllihuaya and Huerta Huaraya), and they were collected at random. Second, the bacterial genera were cultivated in culture media with APC agar supplemented with three concentrations of the toxins (2%, 3% and 6%), where the number of colonies of each bacterium in each treatment were counted. The results were: in Ichu, the counts were 51 UFC/g and 98 UFC/g, in Jayllihuaya 82 UFC/g and 93 UFC/g and in Huerta Huaraya 271 UFC/g and 289 UFC/g; tolerance was higher in bacteria of the genus *Bacillus* sp. It is concluded that the soils of the Puno district have mean edaphic bacterial load counts and the isolated bacteria are capable of tolerating concentrations of 6% of insecticide, being better the bacteria of the genera *Bacillus* sp and *Pseudomonas* sp.

**Key words:** Bacteria, insecticides, soils, tolerance



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Uno de los contaminantes más importantes de los suelos en los campos de cultivo en la región Puno son los pesticidas, entre insecticidas, larvicidas, herbicidas entre otros, los cuales vienen originando impactos negativos en la flora, la fauna y las fuentes de agua de consumo de animales y humanos (Eskenazi *et al.*, 2004), asimismo dichos insecticidas disminuyen la población de microorganismos entre bacterias y hongos benéficas, erosionando y disminuyendo la fertilidad de los suelos (Betancur *et al.*, 2013), por lo que se desea investigar la presencia de bacterias de tres suelos del distrito de Puno para evaluar su capacidad de tolerar la presencia de dos insecticidas y si poseen esta capacidad podríamos asumir también la capacidad de degradar a dichos insecticidas en condiciones *in vitro*.

Las bacterias son microorganismos que habitan diferentes ecosistemas, principalmente los suelos. Su gran biodiversidad hace que posean diferentes funciones metabólicas, como fertilizar suelos, ser antagónicos de otros microorganismos, así también algunas degradan contaminantes como los plaguicidas. En la revisión bibliográfica se encontró que las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis* y *Serratia marcescens* degradan pesticidas (Furukawa y Miyazaki, 1986), razón por la cual se planificó primero realizar los recuentos y aislamiento de la carga bacteriana de suelos de tres localidades de la provincia de Puno, donde se aplican los plaguicidas Matador y Tamaron, a partir de ellos se aislaron a los géneros *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Serratia* sp y evaluar si toleran a los pesticidas para su posible utilización en el futuro, en la biorremediación de pesticidas en suelos mediante bacterias.



Los pesticidas evaluados en la investigación para la determinación de tolerancia bacteriana fueron Matador y Tamaron, normalmente se expenden en las tiendas de agroquímicos en las ciudades de la región Puno, pero muchas veces los agricultores exageran sus aplicaciones a lo recomendado por los fabricantes, quedando residuos en los suelos causando alteraciones fisicoquímicas y su bioacumulación en seres vivos en los ecosistemas, desencadenaría en rupturas de cadenas tróficas, intoxicaciones, entre otros efectos.

La presencia de residuos de plaguicidas en los productos de pan llevar como: papa, quinua, habas, ocas, entre otros cultivos, se debería a que algunos campos de cultivo del distrito de Puno, estarían siendo fumigados con productos agroquímicos entre ellos los insecticidas Matador y Tamaron, los cuales traerían como consecuencia las formaciones teratogénicas e intoxicaciones en animales y seres humanos, que no solo consumen alimentos sino muchas veces el agua que producto de las lluvias, los insecticidas podrían ser arrastrados desde los campos de cultivo hacia los ecosistemas acuáticos (Gisbert y Villanueva, 1992).

Por lo que en esta investigación se plantea evaluar la primera etapa de una serie de investigaciones biotecnológicas para la biorremediación de insecticidas, como lo son las pruebas de tolerancia *in vitro* de las bacterias aisladas a partir de los suelos de campos de cultivo, en el cual existe la persistencia de insecticidas, y al evaluar bacterias tolerantes existiría la potencialidad de que lograrían degradar a este tipo de contaminantes (Hernández *et al.*, 2017), ya que se propone que entre los microorganismos presentes en el suelo, las bacterias son aquellas que presentan un mayor número y poseerían la



capacidad de degradar insecticidas.

Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la tolerancia *in vitro* a dos insecticidas organofosforados Matador y Tamaron de bacterias aisladas de campos de cultivo del distrito de Puno.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Cuantificar la carga bacteriana de suelos de tres campos de cultivo de las localidades de Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya.
- Determinar la tolerancia a los insecticidas Matador y Tamaron en tres concentraciones de las bacterias previamente aisladas.



## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

Armado *et al.* (2018) en suelos de una empresa dedicada a la actividad metalúrgica de Tinaquillo (Cojedes – Venezuela), reportan promedios de cargas bacterianas de  $6.65 \times 10^5$  UFC/g en época lluviosa y de  $1.73 \times 10^5$  UFC/g en época de sequía, con una reducción entre 30 y 80% de carga bacteriana. Silberman (2016) al evaluar la diversidad microbiana y materia orgánica del suelo en sistemas silvopastoriles de la Región Chaqueña (Argentina), determinaron recuentos de bacterias heterótrofas aerobias de 1'584,893 UFC/g de suelo en invierno, 794,328 UFC/g en verano, ambos en sitio subhúmedo y de 501,187 UFC/g de suelo en invierno, 794,328 UFC/g en verano, ambos en sitio semiárido. Beltrán (2014) en suelos cultivados con papa en Boyacá (Colombia), determinó recuentos bacterianos entre 416 y 4897 UFC/g de suelo para las fincas El Recuerdo y La Escuela respectivamente, sin presentar diferencia estadísticamente significativa.

Pérez (2014a) en un suelo arenado en Almería (España), registraron recuentos de bacterias que oscilaron entre  $0.1 - 23.0 \times 10^2$  UFC/g de suelo. Romero *et al.* (2009), en suelos de Boyacá (Cundinamarca – Colombia), al evaluar la abundancia microbiológica de tres estratos erosionados, reportaron recuentos bacterianos de  $83 \times 10^2$  UFC/g con 6 grupos de colonias,  $1.32 \times 10^5$  UFC/g con 10 grupos de colonias y  $1.15 \times 10^5$  UFC/g con 8 grupos de colonias. Calvo *et al.* (2008) estudiaron poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa en zonas altoandinas y reporta recuentos de bacterias que





oscilaron de  $10^6$  y  $10^8$  UFC/g. Bernal *et al.* (2006) en suelos de Guerrero Zipaquirá (Colombia), encontraron cifras de 21'877,616 UFC/g de suelo. Sivila de Cary y Angulo (2006) en suelos del altiplano boliviano reportaron recuentos de 11'481,536 UFC/g para poblaciones bacterianas y Diáñez (2005) con recuentos bacterianos de 601.76 – 1470.15 x  $10^6$  UFC/g de suelo.

Mendía (2020) en Ecuador, en campos de cultivo de papa con 103 ppm de malatión residual, determinó degradaciones del 53.96% por *Stenotrophomonas maltophilia* y 42.99% por *Bacillus cereus*, sin mostrar diferencia estadística significativa. Valdivieso (2019) en Ecuador a concentraciones de 800 y 1,600 ppm, la bacteria *B. cereus* presentó una tasa de degradación del pesticida organofosforado LORSBAN 480 a los 30 días del 96% y *B. thuringiensis* y *Pseudomonas* sp. en 73%. Mireles *et al.* (2018) en México, registran 26 aislamientos con diferentes características morfológicas en Firmicutes y Actinomycetes, de los cuales el 63% de los aislamientos exhibieron alta tolerancia al insecticida imidacloprid y el 37% tuvo una media, escasa o nula tolerancia, inclusive degradaron al insecticida. Rodríguez (2018) en el distrito de Moche (Trujillo – Perú), se demostró que *Serratia marcescens* en un suelo con 62.98 ppm de malathion y una concentración bacteriana de  $10^7$  UFC/ml, removi6 el 0.87% al primer día, 3.96% al día dos y 9.69% en el día tres y a una concentración inicial de  $10^8$  UFC/ml se obtuvo el 2.70% al día uno, 6.20% al día dos y 12.53% al día tres.

Kopytko *et al.* (2017) en Colombia, aislaron cepas bacterianas de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromona caviae*, y *Bacillus* sp, que en aplicadas al suelo en concentraciones de  $10^8$  UFC/ml, lograron la remoci6n de DDT, DDD y DDE en 56.2%, 17.1% y 44.5% respectivamente en un proceso aerobio por 20 días, más aún.



Hernández *et al.* (2017) confirman que la biorremediación convierte los plaguicidas clorpirifós en compuestos más simples y poco tóxicos utilizando el metabolismo microbiano, entre ellos las bacterias, *Serratia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, dependiendo de la biodisponibilidad, la concentración del organofosforado, del pH, la temperatura y el tipo de suelo. Oviedo y Díaz (2017) determinaron que las cepas nativas que toleraron concentraciones de 1000 ppm de atrazina, fueron *Pseudomonas* sp, *Streptomyces* sp, y *Arthrobacterium* sp, con mayor crecimiento a 37°C, pH de 6 y 9 y sensibles al pH 5. Jaramillo *et al.* (2016) en Cartagena de Indias (Bolívar – Colombia), determinando tres cepas bacterianas aisladas de los suelos (C1, C2 y C3) de la familia Enterobacteriaceae, degradaron pesticidas organofosforados a concentraciones de 200 ppm en 30 días de tratamiento. Castellanos (2016) determinó la biodegradación microbiana de N-metilcarbamatos, por la vía hidrolítica, con bacterias *Sphingomonas* sp. y *Novoshingobium* sp., caracterizado por su alta plasticidad metabólica de este tipo de compuestos.

Marín y Jaramillo (2015) en suelos de Córdova (Colombia), determinaron a demetón – Smetilsulfón en concentraciones de 272.9 y 1793.3 mg/kg en los suelos de campos de cultivo y las bacterias nativas *Bacillus* sp y *Pantoea agglomerans*, degradaron a clorpirifos entre el 73.5% y 68.67%. Pérez (2014b) en Imbabura (Inanbura), aisló a las bacterias *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp y *Arthrobacter* sp, y lograron biodegradar el pesticida Cleaner al 100%. Tirado *et al.* (2014) en suelos de Cartagena (Bolívar – Colombia) con 200 ppm de Monocrotofós por 30 días, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas aeruginosa*, disminuyeron el pesticida a las 72 horas de incubación. Calle y Ode (2014) en el Perú en el valle rio Apurímac, Ene y Mantaro en cultivos de *Erythroxylum coca* (coca) y *Theobroma cacao* (cacao), experimentaron la



capacidad biodegradadora bacteriana de Carbofurén para plantear alternativas de solución como la biorremediación, en ellas *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Aeromonas* en cultivos de *Theobroma cacao* y los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus* y *Proteu*.

Leal *et al.* (2014) en el Estado de Sonora (México), determinaron residuos de plaguicidas organoclorados en la localidad de Caborca de 1.22 – 9.62 µg/kg, en Hermosillo hasta 7.49 µg/kg, Magdalena de 0.73 – 24.40 µg/kg, en Ures hasta 18.78 µg/kg y Guaymas de 1.43 – 45.75 µg/kg, sien los mayores el DDE, endosulfán,  $\gamma$ -clordano, heptacloro epóxido y endrín. Sánchez y Henry (2012), usaron *Bacillus licheniformis* y degradaron el 24% del contaminante agroquímico Aldrín persistentes en Santa Marta (Colombia) ya que es capaz de tolerar y degradar en condiciones aerobias. Montoro *et al.* (2009) en Chupaca y Concepción (región Junín), manifiestan que los agricultores manipulan directamente a los plaguicidas extremadamente y altamente peligrosos, como Tamaron® y Furadan®, pudiendo originar casos de intoxicación los cuales se incrementaron durante los años 2001 a 2004.

Quinchía *et al.* (2006) evaluaron la resistencia de *Pseudomonas* sp frente al insecticida Lorsban 4EC en Antioquía (Colombia), al exponerlo a concentraciones 480 ppm, 4,800 ppm, 2,4000 ppm y 48,000 ppm, lograron resistir al insecticida con las concentraciones estudiadas y puede poseer la capacidad de degradar el insecticida. Hernández *et al.* (2005) aislaron 10 cepas bacterianas aisladas de nódulos de una leguminosa del género *Desmodium tortuosum*, en Veracruz (México) y sometidas a Malatión lograron la disminución en la concentración y produjeron productos intermedios



como ácidos O,O,S-trimetil fosfotioico y O,O,Strimetil fosforoditioico, dimetil ester,  
ácido tiofenil carboxílico



## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 Suelo y sus características

El suelo posee una comunidad biológica muy compleja, donde los organismos del suelo son muy diversos y contribuyen a una amplia gama de funciones que son esenciales para el funcionamiento sostenible de los ecosistemas naturales (Barrios, 2007). Entre estos, las bacterias poseen importantes potencialidades biodegradadoras (Kuai *et al.*, 1999). Los grupos funcionales de microorganismos involucrados en diferentes etapas de los ciclos de nutrientes son parte integral de los procesos de revegetalización y pueden ser usados como indicadores de la calidad del suelo o como una herramienta biotecnológica disponible para reducir su erosión en general (Bashan *et al.*, 2004).

En el reporte titulado “Estudio de suelos y capacidad de uso mayor (Departamento de Puno)”, realizado por el GRP (2014), indican que se denomina suelo a los cuerpos continuos que se ubican en el estrato superficial de la corteza terrestre, y pueden ser caracterizados como cuerpos naturales, tridimensionales, independientes y dinámicos, su formación se origina gracias a la interacción de diversos procesos y factores de participan en su formación, en el mencionado reporte, la descripción y clasificación se realizó en base a su morfología. En el departamento de Puno, los suelos se formaron a partir de materiales parentales de diferentes orígenes, los cuales se detallan a continuación:

- a. **Suelos lacustres.** Se forman de materiales finos de origen lacustre, son profundos y en áreas cercanas al lago Titicaca están limitados por la napa freática alta. Se ubican en superficies planas a levemente depresionadas, y mayormente al norte del departamento, posee un perfil edáfico algo evolucionado, textura fina, reacción neutra a alcalina, alto contenido de sales y sodio intercambiable y drenaje



imperfecto a pobre.

- b. Suelos aluviales recientes.** Se forman de materiales por acción fluvial (ríos), se ubican en superficies planas a ligeramente inclinadas, son moderadamente profundos, pero hay superficiales, perfil poco evolucionado, textura media a gruesa, reacción neutra a moderadamente ácido y drenaje moderado a algo excesivo, su profundidad está limitada por una capa arenosa con abundante grava.
- c. Suelos aluviales subrecientes.** Se forman de materiales aluviales de origen más antiguo que la anterior clasificación, están distribuidos en superficies planas a ligeramente inclinadas, son moderadamente profundos, ligeramente evolucionado, textura media a fina, reacción neutra a moderadamente ácido y drenaje variado.
- d. Suelos coluvio – aluviales.** Se formaron de materiales originados por la acción de las precipitaciones y la gravedad, están distribuidos en superficies de laderas, en pie de montes de colinas y montañas, así como en conos de deyección, su perfil edáfico es profundo, posee una evolución variada, textura media a gruesa, reacción neutra a fuertemente ácido y drenaje algo excesivo a imperfecto, presentan cierto contenido de gravas y piedra pequeña y redondeada (guijarros) en su perfil.
- e. Suelos glaciales.** Se forman desde materiales de origen fluvio glacial, están distribuidos en zonas de relieve plano a empinado, en la zona occidental, principalmente, su perfil edáfico es profundo, poco evolucionado, textura gruesa a media, reacción ácida y de drenaje bueno a moderado, presentan un perfil con contenido de gravas y guijarros, y piedras en zonas de menor pendiente.
- f. Suelos de materiales residuales.** Se forman desde materiales originados en el lugar (*in situ*), derivan de rocas volcánicas, rocas sedimentarias, intrusivas, entre



otras, están distribuidas en todo el departamento de Puno, iniciando en las zonas onduladas hasta llegar a las montañas, su perfil edáfico tiene una profundidad efectiva variada, generalmente contienen material grueso y en superficies de afloramiento lítico.

- g. Suelos de origen antrópico.** Estos fueron modificados por acción antrópica, se encuentran en los andenes, y fueron construidos en laderas de montañas, para aprovechar las superficies inclinadas y así evitar la erosión, por otro lado, se tiene los camellones o waru – warus, que se construyen en superficies planas, y así se aprovecha las áreas con napa freática alta (GRP, 2014).

### 2.2.2 Bacterias en suelos

En el año de 1903, se registró que algunos microorganismos presentaban la capacidad de solubilizar el fosforo (P) presente en el suelo, entonces se sugirió que ellos podrían jugar un papel importante en la nutrición fosfórica de las plantas, por lo que se han hecho numerosos avances en cuanto a la comprensión de los mecanismos responsables de los procesos que esto implica y en el conocimiento de la biodiversidad microbiana que presentaran esta capacidad (Yarzabal, 2010) en cuanto a la relación con los mecanismos, la mineralización del P orgánico depende de la secreción de enzimas fosfatasas siendo principalmente la fitasa, mientras que la solubilización causada a partir de fuentes minerales como fosfatos mono y dibásicos considerando especialmente del tipo de las apatitas, estos se encuentran ligados a la producción de ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y/o a la liberación de protones, productos del metabolismo primario del organismo solubilizador (Marschner, 2011) no obstante, y a pesar de las potencialidades ambientales y económicas implícitas en el uso de los Microorganismos solubilizadores de P (fosforo) como biofertilizantes, estas investigaciones son escasas, por lo que aún no



pueden ser considerados una tecnología, especialmente en el trópico (Uribe y Sánchez, 2010).

El CO<sub>2</sub> es oxidado en la naturaleza por las bacterias que presentan la capacidad de producir la enzima monóxido de carbono oxidasa, estas son conocidas como bacterias carboxidótrofas, estas son organismo quimiolitótrofos los cuales son capaces de utilizar el monóxido de carbono como única fuente de carbono y energía (Meyer y Schlegel, 1978) su gran diversidad taxonómica, comprende más de 15 especies, la mayor parte de estas bacterias conocidas y caracterizadas fueron aisladas del suelo y aguas residuales (Drake, 1974).

### **2.2.3 Insecticidas organofosforados**

La mayoría de pesticidas son confundidos con los insecticidas, pero estos abarcan tanto a los insecticidas como a muchos otros tipos de sustancias químicas (Departamento de Reglamentación de Pesticidas de California). La FAO (1979) define a un plaguicida como aquella sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, esto incluye vectores de enfermedad humana o animal, algunas especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción de los alimentos, otros productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos animales, también aquellos que pueden ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en sus organismos (WHO, 1992) estos compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y sus derivados, que comparten como característica farmacológica la acción de inhibir enzimas con actividad esterásica, más específicamente de la acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, lo que genera una acumulación de acetilcolina esto logra alterar el





funcionamiento del impulso nervioso, estos compuestos son liposolubles y volátiles, características que facilitan su absorción; presentan diversos niveles de toxicidad pudiendo ser de nivel I, II o III, los efectos farmacológicos varían de acuerdo al grado de toxicidad y vía de entrada en el organismo (Weselak *et al.*, 2007).

El cuadro de intoxicación por organofosforados genera un espectro de signos y síntomas característicos, conocido como síndrome colinérgico que se presenta como consecuencia de la excesiva estimulación de los receptores de acetilcolina, y que se caracteriza principalmente por cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular y excesiva actividad secretora. El manejo oportuno de este síndrome es clave para evitar complicaciones graves secundarias a la intoxicación e incluso el compromiso de la vida del paciente (Eddleston *et al.*, 2005). Los organofosforados son aquellas sustancias orgánicas derivadas de la molécula del ácido fosfórico. Estos forman parte de los insecticidas “de contacto” ya que son absorbidas por intermedio de los lípidos del caparazón de los insectos (Gisbert y Villanueva, 1992) son utilizados en algunos países como armas de guerra química o terrorista; es el “armamento de los países pobres” de potencial mortífero muy elevado y bajo precio.

Pueden emplearse como aditivos en diferentes industrias: petróleo, disolventes, colorantes, barnices, cuero artificial, etc. En el ámbito doméstico constituyen la formulación de insecticidas habituales pero debido al manejo incorrecto por parte de determinadas empresas fumigadoras, los insecticidas organofosforados (IOP) están siendo utilizados en la desinfectación de áreas y edificios públicos sin realizar las medidas preventivas necesarias, hecho que conduce a numerosas bajas laborales e incluso casos de invalidez parcial y total de empleados y personal relacionado con dichos centros



(hospitales, piscinas, etc.) (Benavidez y García, 1997) las intoxicaciones agudas y complicaciones crónicas producidas por los IOP constituyen en la actualidad un importante problema de Salud Pública (Satoh y Hosokawa, 2000).

#### a. Tamaron

Es un insecticida agrícola organofosforado, tiene una presentación de líquido soluble, cuyo compuesto activo es denominado Chlorpirifos (Tabla 1). Se aplica llenando el tanque de aspersión con agua limpia hasta la mitad de su volumen máximo, luego se agrega Tamaron, posteriormente se agrega agua por hectárea con las dosis recomendadas por el fabricante. Las plagas que controla el pesticida Tamaron, son: *Epicauta adspersa*, *Nezara viridula*, *Empoasca fabae*, *Spodoptera frugiperda*, *Phthorimaea operculella*, *Scrobipalpula absoluta*, *Aphis gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus persicae*, *Epitrix fasciata*, *Diabrotica speciosa*, *Thrips tabaco*. La dosis a utilizar es de 0.8 a 1.0 litros/ha (Ecured, 2020). La acción farmacológica de Tamaron viene a ser la inhibición de enzimas que poseen actividad esterásica, puntualmente la acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, generando la acumulación y su exceso provoca los síntomas mencionados (Fernández *et al.*, 2010).

**Tabla 1.** Propiedades del insecticida Tamaron (indicaciones del fabricante).

| Característica                      | Cualidad / valor                                  | Característica                | Cualidad / valor                            |
|-------------------------------------|---|-------------------------------|---|
| Tipo de insecticida agrícola        | Organofosforado                                   | Densidad                      | 1.07 a 1.10 g/mol                           |
| Nombre común del ingrediente activo | Chlorpiriphos                                     | pH                            | 4.5 a 6.5                                   |
| Fórmula empírica                    | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> PS | Inflamabilidad                | Inflamable                                  |
| Peso molecular                      | 350.6 g/mol                                       | Corrosividad                  | No corrosivo                                |
| Apariencia                          | Líquido translúcido                               | Explosividad                  | No explosivo                                |
| Color                               | Ámbar   | Estabilidad al almacenamiento | El producto es estable como mínimo 24 meses |
| Olor                                | Ligero olor a organofosforados                    | --                            | --  |

**b. Matador**

Posee con compuestos activo al Methamidofos (Tabla 2), es un insecticida muy específico para controlar larvas de lepidópteros que dañan a muchos cultivos, según sus indicaciones sin afectación a los insectos benéficos, su efecto fisiológico es inhibir la síntesis de la acetilcolinesterasa, inactivándose la producción de la acetilcolina, interrumpiendo el impulso nervioso. Se aplica para el control de los insectos de las familias Tisanópteros y Lepidópteros, aplicándose a cultivos de cebolla, alcachofa, maíz, espárrago, tomate y pimiento. En los insectos se presentan los síntomas como las convulsiones, temblores, hiperexcitación y parálisis. La concentración letal media (CL50) en ratas fue mayor a 0.258 mg/l en el aire por 4 horas, no origina irritación cutánea pero sí irrita los ojos; mientras tanto, en conejos se observa pérdida de coordinación, contracción de la pupila, temblores, salivación

abundante, convulsiones y letargia, desapareciendo al día siguiente de la exposición (ADAMA, 2020).

**Tabla 2.** Propiedades del insecticida Matador (indicaciones del fabricante).

| Característica                      | Cualidad / valor             | Característica                | Cualidad / valor                            |
|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---|
| Tipo de insecticida agrícola        | Organofosforado              | Densidad                      | 1.2 a 1.3 g/mol                             |
| Nombre común del ingrediente activo | Methamidofos                 | pH                            | 2.0 a 4.5                                   |
| Fórmula empírica                    | $C_2H_8NO_2PS$               | Inflamabilidad                | No inflamable                               |
| Peso molecular                      | 141.1 g/mol                  | Corrosividad                  | No corrosivo                                |
| Apariencia                          | Líquido viscoso              | Explosividad                  | No explosivo                                |
| Color                               | Incoloro o ligeramente ámbar | Estabilidad al almacenamiento | El producto es estable como mínimo 24 meses |
| Olor                                | Pungente                     | --                            | --  |

#### 2.2.4 Efectos de los insecticidas organofosforados en el medio ambiente

La utilización de pesticidas es frecuente en la agricultura y viene originando muchos estragos en los diferentes ecosistemas, debido a su toxicidad, así como a los procedimientos de aplicación y uso, generando riesgos a la sobrevivencia de la gran biodiversidad en los agroecosistemas y por tanto a nivel internacional se constituye en un problema ambiental urgente en países tropicales (Bravo *et al.*, 2011). La aplicación de pesticidas origina alarma de acumulación en suelos, agua y organismos y por su persistencia depositarse en el suelo, bioacumulándose en las plantas, que ulteriormente muchas veces pueden ser consumidos por el ganado o el ser humano (Niti *et al.*, 2013). Fungicidas como el mancozeb que posee una vida media 17 días en el suelo, puede



degradarse vía fotólisis, descomposición biológica o hidrólisis, y por producto se la degradación se obtiene la etilenotiourea (ETU), el cual es un compuesto muy tóxico que daña la glándula tiroides, el sistema digestivo y es cancerígeno (Shukla y Arora, 2001), pero posee una alta solubilidad en suelo y agua (Paro *et al.*, 2012).

El mancozeb aplicado a los suelos por 10 años experimentalmente, originó la acumulación de Mn y ETU, en las propias zonas en los alrededores, constituyéndose en un grave riesgo para la salud pública y el ambiente (Maroni *et al.*, 2006). Estos agroquímicos perturban la salud de los trabajadores, los que aplican, los que manipulan el producto y las personas que habitan zonas aledañas ya que son muy solubles en el agua, se dispersan por el aire llegando a las casas cercanas a las aplicaciones (Trejo *et al.*, 2014). En América Latina y África, se protegen a los plátanos con clorpirifós, ya que repele el ataque insectos durante la formación de los racimos (Aguirre *et al.*, 2014), pero este pesticida posee un grave efecto tóxico, originando daños neurológicos en niños, en mujeres embarazadas origina bajos pesos en recién nacidos (Eskenazi *et al.*, 2004), inclusive estarían propensos a originar retrasos en el desarrollo mental y motor (Rauh *et al.*, 2012). Una exposición humana a pesticidas por plazos largos ocasiona cáncer, malformaciones, alteraciones en la fertilidad, alergias, bajo peso al nacer, inmunosupresión, daño al sistema respiratorio, desórdenes neurológicos de comportamiento y desarrollo, problemas dermatológicos, hipersensibilidad, daño al sistema nervioso y pérdida de la memoria a corto plazo (Woignier *et al.*, 2014).

Los compuestos organofosforados ingresan a un organismo mediante la inhalación de vapores o polvos, por medio de la piel y mucosas expuestas, siendo mayor a altas temperaturas y la presencia daños a la piel y absorción gastrointestinal (Dreisback



y Robertsonm, 1988). Cole *et al.* (1988), en Nicaragua examinaron trabajadores agrarios, mediante la determinación de colinesterasa serológica, estos fueron superiores en temporadas de campaña agrícola, debido a la aplicación aérea, pero al final reportaron 6 muertes y 396 intoxicaciones a causa del organofosforado Parathion Metil, principalmente debido a la exposición dermal. Zhang *et al.* (1992). Abebe y Mekuria (1991) reportan en Etiopía a causa de pesticidas organofosforados, presentaron el típico rasgo de hiperactividad parasimpática a causa de la inhibición de la colinesterasa, se presentó una mortalidad el 20% debido al Paration y Malathion, por lo que se observa una gran necesidad de control de la venta de ciertos pesticidas disponibles, así como de capacitaciones en las consideraciones de uso.

### **2.2.5 Tolerancia bacteriana a insecticidas**

En la investigación se ha considerado la terminología tolerancia en razón de que las bacterias nunca antes fueron controladas por insecticidas y poseerían la capacidad natural heredable de una especie para sobrevivir y reproducirse ante la presencia de un principio activo, en este caso los insecticidas experimentados. Los agroquímicos entre ellos los insecticidas aplicados en los sistemas de producción originan una acción a la microbiota del suelo, perturbando poblaciones microbianas de interés biológico expuestas, a nivel bioquímico, entre ellas disminuyen su actividad biofertilizante, disminuyendo el crecimiento vegetal (Paoletti, 1999).

Entre las bacterias que degradan plaguicidas, se encuentran muchas heterótrofas, metabolizando dichas moléculas o bien las usan como nutriente y fuente de energía, tales como *Azotobacter* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Flavobacterium* sp, *Agrobacterium* sp, *Clostridium* sp, entre otras bacterias (Madigan *et al.*, 2004). La capacidad



biodegradadora y de transformación de los plaguicidas, es variable y depende de la movilidad, disponibilidad y toxicidad del agroquímico, los parámetros fisicoquímicos del suelo y del propio plaguicida, así como también los factores medioambientales (Racke, 1990).

La biorremediación es una de las estrategias que se emplea hoy para reducir los efectos de los plaguicidas, que trata del uso de organismos vivos, enzimas libres y componentes celulares, logrando la mineralización o conversión parcial de los compuestos xenobióticos (Madigan *et al.*, 2000), siendo estos de bajo costo, bajo mantenimiento, asimismo es amigable con el medio ambiente y es fácilmente aplicable *in situ* (Atrevi *et al.*, 2002). Las investigaciones determinaron que los microorganismos, son los responsables de degradar a los compuestos xenobióticos en especial los plaguicidas (Ou *et al.*, 2001), debiéndose al uso de dichos químicos en los cultivos agrícolas, por tal motivo han desarrollado mecanismos de adaptación genética, como la síntesis de enzimas hidroxilán, oxidan a los plaguicidas, muchos los utilizan como única fuente de carbono y/o nitrógeno, azufre o fosforo, mineralizándolos logrando la detoxificación de los plaguicidas por actividad cometabólica (Desaint *et al.*, 2003).

Muchos microorganismos poseen la capacidad de degradar plaguicidas, entre ellos se mencionan a las bacterias Gram negativas como *Rhizobium* sp (Hashimoto *et al.*, 2002), *Sphingomonas* sp (Wu *et al.*, 2006), *Achromobacter* sp (Tomasek y Karns, 1989), *Pseudomonas* sp, (Bano y Musarrat, 2004) y *Novosphingobium* sp (Yan *et al.*, 2007) y las que pertenecen al grupo metilótrofos facultativos como *Aminobacter ciceronei* (Topp *et al.*, 1993). Chauldry y Ali (1988), aislaron a bacilos Gram negativos en células individuales o cadenas cortas, con reacción oxidasa y catalasa positivos, con todas esas



pruebas se determinaron que pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* sp o *Flavobacterium* sp

### **2.2.6 Biorremediación bacteriana de insecticidas**

Los organismos como bacterias, hongos y plantas realizan la biodegradación, debido a que tienen la capacidad de degradar o descomponer compuestos químicos, gracias a las reacciones y procedimientos bioquímicos propios de cada uno, para obtener energía y nutrientes. Entre ellas las bacterias metabolizan azúcares para sintetizar ATP, que viene a ser la fuente de energía celular, e inclusive muchas de ellas posee reacciones metabólicas propias para degradar compuestos químicos productos xenobióticos. La biorremediación tiene como objeto la limpieza del medio ambiente que contiene contaminantes, utilizando organismos vivos con potencial degradador de materiales peligrosos a sustancias menos tóxicas (Thieman y Palladino, 2010). Se aplican procesos de biorremediación para restaurar o limpiar suelos, aguas subterráneas y aire impregnados con xenobióticos, en tal sentido se constituiría en una tecnología de biorestauración de ambientes naturales que poseen xenobióticos, con la finalidad de eliminarlos, atenuarlos o transformarlos mediante la capacidad metabólica microbiana (bacterias, levaduras, mohos y algas) y muchas plantas (Rodríguez y Rodríguez, 2019).

La biorremediación es una alternativa para la transformación de los plaguicidas en compuestos más simples o poco tóxicos, utilizando el potencial metabólico de los microorganismos principalmente hongos y las bacterias (Álvarez *et al.*, 2017). Dichos microorganismos serían muy efectivos en degradar pesticidas, donde la ventaja que poseen es que pueden ser controlados para lograr la estimulación del crecimiento, buscando la obtención de biomasa viable con actividad metabólicas específica para lograr





la biodegradación de plaguicidas (Luján, 2019).

Los géneros bacterianos con potencial biorremediador se mencionan a *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Flavobacterium*, los cuales poseen la capacidad de degradar pesticidas, se añan a ellos los actinomicetos ya que biotransforman y biodegradan de los pesticidas, entre ellos se tienen a los géneros *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Clavibacter*, *Nocardioides*, *Nocardia* y *Streptomyces*, en estos microorganismos no se conoce la vía metabólica que realizan, lo único que se conoce es que producen enzimas extracelulares con capacidad de degradar muchos compuestos orgánicos complejos (Luján, 2019).

Experiencias en suelos de cultivo donde se aplican pesticidas organofosforados como demeton – metilsulfón, entre los microorganismos que los degradarían se citan a *Bacillus* sp y *Pantoea agglomerans*, con 73.5% y 68.67% a los compuestos organofosforado y clorpirifos, respectivamente, lográndolos degradar hasta concentraciones de 200 ppm de clorpirifos, que los utilizan como fuente de carbono en periodo de 120 horas. Las bacterias utilizan a la enzima fosfotriesterasa en el metabolismo del insecticida, siendo de utilidad en los procesos de biorremediación (Marín y Jaramillo, 2015). Por otro lado, *Serratia plymuthica* y *S. liquefaciens* demostraron degradar también a éstos compuestos, quienes también a los plaguicidas los utilizan como única fuente de carbono (Álvarez *et al.*, 2017), en tal sentido, estos microorganismos abundan en ambientes impactados por el contaminante y es limitado en lugares no contaminados (Madigan *et al.*, 2004). Entre las tecnologías de biorremediación, las bacterias se constituyen en el grupo microbiano con mayor actividad, por la gran variedad de géneros y especies, así como también por la versatilidad metabólica que presentan. La agrupación



de varias especies, también llamadas poblaciones mixtas, consorcios o cohortes microbianas, poseen mayor acción biodegradativa ya que muchos microorganismos son especializados y cooperan entre ellos, entre ellos se citan tanto en suelos como en cuerpos acuáticos a *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Leahy y Colwell, 1990).

Los factores que perturban la eficiencia de la biodegradación son la velocidad de biodegradación de los contaminantes, por tanto se deben considerar a los factores bióticos y abióticos que podrían afectar, por otro lado, se tiene a los factores abióticos o fisicoquímicos relacionados con la estructura química, la biodisponibilidad y la concentración del contaminante y las condiciones medioambientales de pH, temperatura, humedad, nutrientes y disponibilidad; mientras que los factores bióticos dependerán de los microorganismos, su población microbiana y su cometabolismo (Brutti *et al.*, 2018).

### **2.2.7 Genética en la biorremediación de insecticidas**

Las fosfotriesterasas (PTEs) son enzimas que catalizan la degradación mediante un proceso de hidrólisis estereo selectiva, un gran número de fosfotriésteres, se encuentran en muchos organismos desde bacterias hasta mamíferos, exceptos en insectos (CASAFE, 2020), y que por tanto la biosíntesis de la enzima estaría dirigida por los genes que poseerían las bacterias con dicha capacidad. La hidrólisis adiciona una molécula de agua al fosfotriéster y elimina un grupo saliente SN<sub>2</sub>, invirtiendo la configuración absoluta del átomo de fósforo en la molécula fosfodiéster (Lewis *et al.*, 1988). Las PTEs más estudiadas proceden de *Flavobacterium sp* y *Brevundimonas diminuta* (aislada de suelos de Filipinas) también se reportan a las paraoxonasas del suero sanguíneo humano y de conejo (Sogorb *et al.*, 1996). Esta enzima está asociada con la degradación de



muchos compuestos organofosforados, como los pesticidas agrícolas, siendo aislados desde muchas bacterias, hongos y cianobacterias, degradándolos y usándolos como fuente de carbono, energía, nitrógeno o fósforo (Bird *et al.*, 2008).

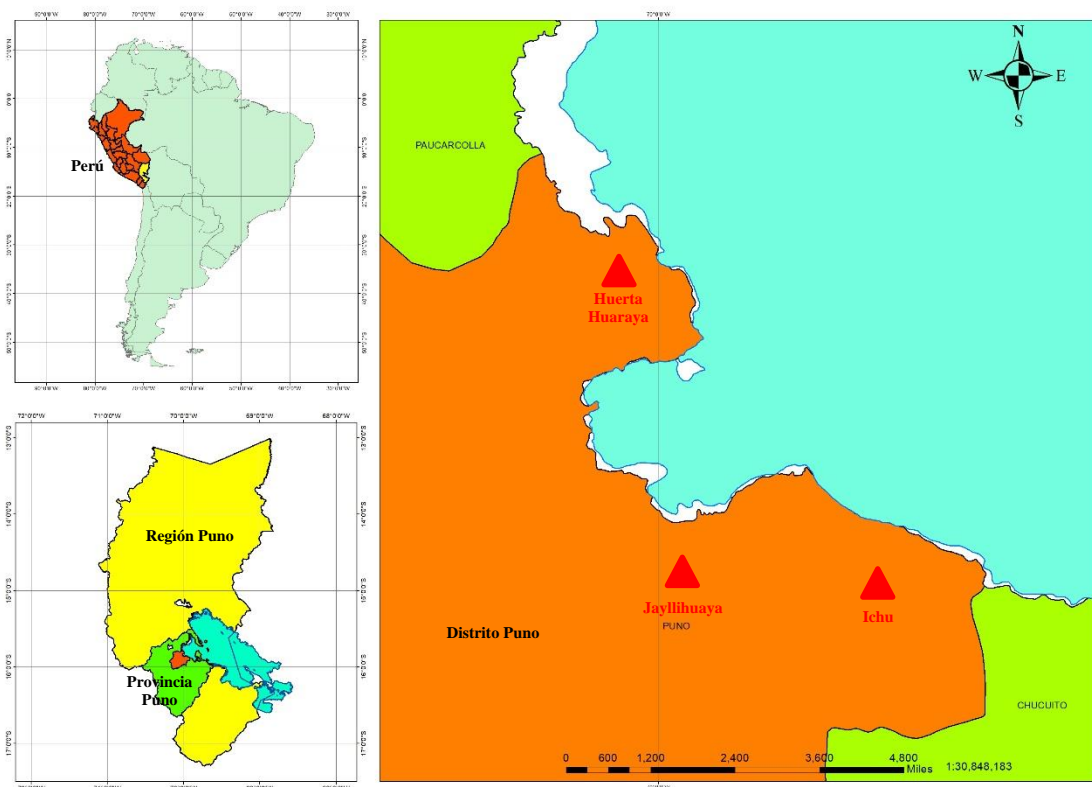
Dentro de las células bacterianas se ubican en sus membranas celulares, mientras que en algunos hongos como *Aspergillus niger* son extracelulares. Las PTEs bacterianas poseen diferencias entre ellas según la evolución de sus genes, entre ellas se encuentran las organofósforo hidrolasa (OPH), expresada a partir del gen *opd*, fue aislada de *Agrobacterium radiobacter* (Home *et al.*, 2002) y la metil paratión hidrolasa (MPH) expresada por el gen *mpd*, fue encontrada en *Plesiomonas* sp (Yang *et al.*, 2006), *Azoarcus* sp, *Methylibium petroleiphilum*, *Leptothrix cholodnii*, *Sinorhizobium meliloti* y *Chromobacterium violaceum* (Zhai *et al.*, 2013), también se tiene a la anhidrolasa ácida de organofosforados (OPAA), expresada por el gen *opaA*, que procede de proteasa (dipeptidasa) (Manco *et al.*, 2018), fue aislada de *Alteromonas undina* y *Alteromonas haloplanktis* (Cheng *et al.*, 1999). Actualmente el desafío es la optimización de las enzimas de resistir condiciones adversas del ambiente como el pH y la temperatura y así lograr su versatilidad para un amplio rango de compuestos organofosforados de uso común, incrementándose su eficiencia mediante la mutagénesis y la evolución (Wu *et al.*, 2018).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio de la investigación, fue el distrito, provincia y región Puno, específicamente en las localidades de Huerta Huaraya ( $15^{\circ} 47' 33.5''$  S y  $70^{\circ} 01' 33.1''$  O), Jayllihuaya ( $15^{\circ} 52' 05.9''$  S y  $69^{\circ} 59' 01.7''$  O) e Ichu ( $15^{\circ} 52' 51.5''$  S y  $69^{\circ} 56' 00.9''$  O) (Figura 1), los cuales poseen campos de cultivo de papa, y en razón de que éste cultivo es el más abonado y aplicado con diversos agroquímicos (insecticidas) por los agricultores, es que fueron elegidos en esta oportunidad para evaluar la existencia de bacterias terrestres con capacidad de tolerancia a insecticidas.



**Figura 1.** Zonas de muestreo de suelo ubicadas en el distrito de Puno.

### 3.2 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue de tipo cuantitativa, en razón de que en los resultados se presentan datos numéricos de los experimentos. Por otro lado, el diseño de investigación fue descriptivo (el primero objetivo) y experimental - transversal (el segundo objetivo), debido a que se presenta tratamientos (dos insecticidas) y en tres concentraciones (Artiles *et al.*, 2008).

### 3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

El muestreo realizado en la investigación fue no probabilístico (Casal y Mateu, 2003), y estuvo conformado por seis muestras procedentes de cada localidad de muestreo (Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya) (Figura 12 - Anexos), desdoblados en dos muestreos mensuales en tres meses consecutivos (agosto, setiembre y octubre), haciendo un total de 18 unidades experimentales (Tabla 3), tal como se muestra en la siguiente tabla:

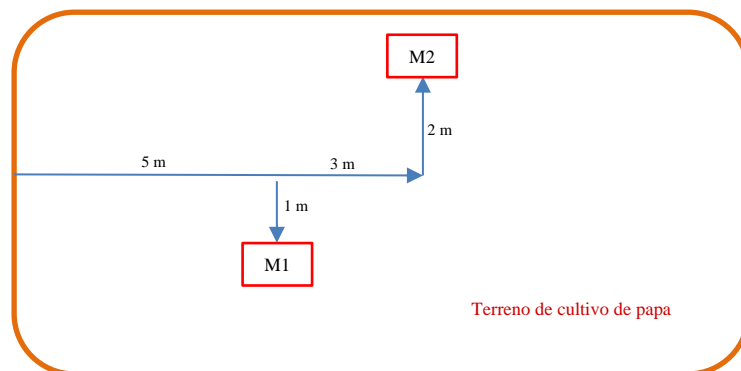
**Tabla 3.** Distribución de muestras por zonas y meses de muestreo.

| Meses de muestreo | Localidades de muestreo |             |                | Total |
|-------------------|-------------------------|-------------|----------------|-------|
|                   | Ichu                    | Jayllihuaya | Huerta Huaraya |       |
| Agosto            | 2                       | 2           | 2              | 6     |
| Setiembre         | 2                       | 2           | 2              | 6     |
| Octubre           | 2                       | 2           | 2              | 6     |
| Total             | 6                       | 6           | 6              | 18    |

### 3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE SUELOS DE TRES CAMPOS DE CULTIVO DE LAS LOCALIDADES DE ICHU, JAYLLIHUAYA Y HUERTA HUARAYA

#### a. Frecuencia de muestreo

En cada localidad (Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya) se realizaron dos muestreos mensuales, los cuales se ejecutaron por tres meses consecutivos (agosto – octubre, 2019). Cada muestra estuvo conformada por 0.5 Kg de tierra. Los campos de cultivo generalmente fueron destinados al cultivo de papa según observación *in situ*. Una vez ubicados en los campos de cultivos, las muestras fueron colectadas al azar, iniciando de la parte media de uno de los lados del ancho del terreno, avanzando 5 m y 1 m hacia la mano derecha (primera muestra M1) y luego a 8 m y 2 m hacia la mano izquierda (segunda muestra M2) (Figura 2).

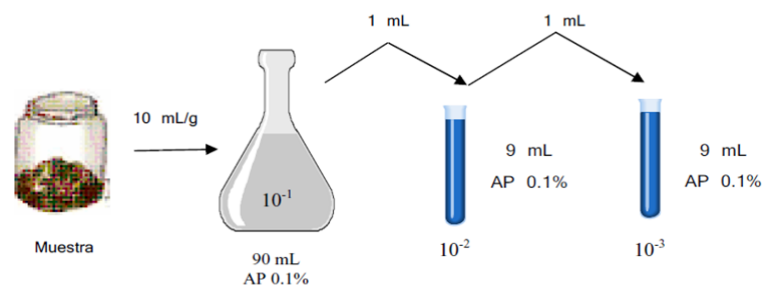


**Figura 2.** Croquis de colección de muestras de tierra (M1 y M2) en campos de cultivo de papa en tres localidades del distrito de Puno.

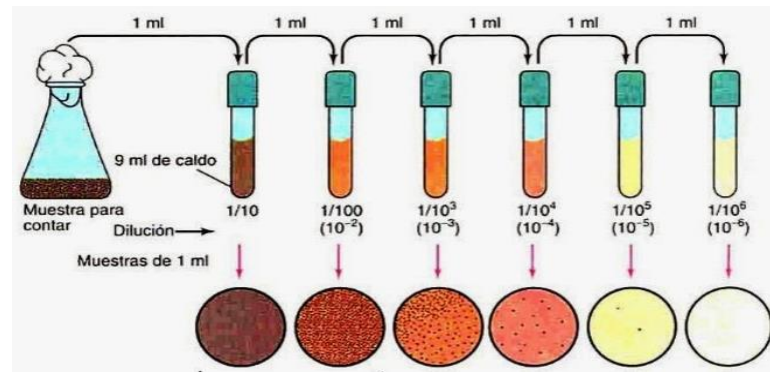
#### b. Descripción detallada del procedimiento

- Se pesó 10 g de muestra de tierra colectados de cada localidad, en una balanza analítica (Figura 13 - Anexos).

- Se transfirió 90 ml de solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.9%) mediante una probeta, se le añadió los 10 g de muestra de tierra ( $10^{-1}$ ) y a partir de él se realizaron diluciones.
- Se colectó 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  y con una pipeta de vidrio estéril se transfirió a otro tubo que contenía 9 ml de solución fisiológica ( $10^{-2}$ ), hasta llegar a la dilución  $10^{-4}$  (Figura 3)
- Los tubos fueron homogenizados en el equipo vórtex (Figura 14 - Anexos).
- A partir de cada dilución ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ), se transfirió 0.1 ml de volumen con una pipeta de vidrio estéril hacia placas Petri con medio de cultivo agar Plate Count (APC) (Figura 15 - Anexos). previamente esterilizada en autoclave y plaqueada en condiciones estériles (Rivera *et al.*, 2002).
- El cultivo se realizó por el método de extensión en placa para ello la siembra se realizó con una aza de Drigalsky, previamente flameada con alcohol para su esterilización (Figura 4).
- Las placas fueron incubadas a 37 °C por 120 horas.



**Figura 3.** Esquema de preparación de diluciones de muestras de tierra colectadas de tres campos de cultivo en localidades del distrito de Puno.



**Figura 4.** Esquema de cultivo en placas de APC de diluciones de muestras de tierra colectadas de tres campos de cultivo en localidades del distrito de Puno.

Los recuentos se realizaron en el equipo cuenta colonias (Figura 16 – Anexos), en las placas con un número de colonias que oscilaron entre 30 y 300 colonias, los promedios de los recuentos de las dos placas (repeticiones) fueron multiplicadas por el factor de dilución y el resultado se obtuvieron en UFC/g de suelo (Figura 4) (Fernández *et al.*, 2006).

#### c. Variables que se analizaron

**Variable independiente:** Campos de cultivo de tres localidades del distrito de Puno.

**Variables dependientes:** Recuentos bacterianos totales en UFC/g suelo.

#### d. Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis

El diseño experimental fue bloque completo al azar, los tratamientos estuvieron conformados por las tres localidades de muestreo (Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya) y tres bloques que fueron los meses de muestreo (agosto, setiembre y octubre), los datos obtenidos de los recuentos bacterianos fueron evaluados mediante prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos ( $P \leq 0.05$ ) (Daniel, 2011), así se estableció la localidad de

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$





muestreo con el más alto y el más bajo recuento bacteriano. El modelo matemático fue el siguiente:

**Donde:**  $i = 1, 2, \dots, t$ ;  $j = 1, 2, \dots, r$ ;  $\mu$  = parámetro, efecto medio;  $\tau_i$  = parámetro, efecto de tratamiento  $i$ ;  $\beta_1$  = parámetro, efecto de bloque  $j$ ;  $\varepsilon_{ij}$  = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental  $ij$ ;  $Y_{ij}$  = observación de la unidad experimental. Los análisis estadísticos se realizarán en el software estadístico Infostat versión estudiantil (Di Rienzo, 2008).

### **3.5 DETERMINACIÓN DE LA TOLERANCIA BACTERIANA A LOS INSECTICIDAS MATADOR Y TAMARON EN TRES CONCENTRACIONES**

#### **a. Frecuencia y muestreo**

Las bacterias aisladas previamente fueron sembradas hasta cultivos puros, con dos repeticiones y cada 15 días, cada genero bacteriano fue sembrado en agar nutritivo marca Himedia, previamente esterilizados en una autoclave, luego se incubaron a 37 °C por 48 horas en una incubadora microbiológica.

#### **b. Descripción detallada del procedimiento**

##### **Caracterización morfológica**

- Se realizó la observación morfológica de las colonias que crecieron en las placas cultivadas en el medio APC.
- A continuación, se seleccionaron aquellas colonias macroscópicamente diferentes según su forma, el color, la superficie, la consistencia y su borde.



- Se colectó una porción de colonia con un asa de siembra y sobre una gota de suero fisiológico sobre una lámina portaobjetos, se inició con el proceso de fijación para realizar la tinción Gram.
- La tinción Gram se realizó a las colonias bacterianas (Figura 17 – Anexos) con los siguientes reactivos, tiempos de aplicación, intercalados con enjuagues de agua destilada: cristal violeta por un minuto, lugol por un minuto, alcohol acetona por 30 segundos y safranina por un minuto.
- Finalmente se observó la morfología bacteriana en el microscopio óptico compuesto.

### **Caracterización bioquímica**

- Se prepararon los medios de cultivo en tubos de ensayo para cada una de las pruebas bioquímicas según las especificaciones brindadas por el fabricante.
- Las colonias fueron sembradas en agar lisina hierro agar (LIA), indol, agar hierro triple azúcar (TSI) y citrato Simmons (CS), tal como se visualiza en la Figura 19 - Anexos (Mc Faddin, 1991; Corrales *et al.*, 2014), todos ellos fueron previamente esterilizados en una autoclave a 121 °C por 15 minutos y 15 libras de presión (Figura 18 - Anexos) y se incubaron en una estufa a 37 °C por 24 horas.
- No se llegaron a identificar las especies de bacterias mencionadas en los antecedentes, por lo que la investigación se realizó con los géneros *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Serratia* sp, las cuales fueron clasificadas según los siguientes resultados de pruebas bioquímicas presentadas en las Tablas 4, 5 y 6.

**Tabla 4.** Características bioquímicas de colonias bacterianas para la identificación de la especie *Pseudomonas* sp (Corrales *et al.* 2014).

| Indol | TSI | CS | Urea | LIA | Movilidad | Oxidasa |
|-------|-----|----|------|-----|-----------|---------|
| -     | K/K | +  | -    | +   | +         | +       |

**Tabla 5.** Características bioquímicas de colonias bacterianas para la identificación de la especie *Bacillus* sp (Márquez, 2007).

| Indol | TSI | CS | LIA | Glucosa | Catalasa | Endospora |
|-------|-----|----|-----|---------|----------|-----------|
| -     | K/A | -  | +   | +       | +        | 1         |

**Tabla 6.** Características bioquímicas de colonias bacterianas para la identificación de la especie *Serratia* sp (Corrales *et al.* 2014).

| Indol | TSI       | CS | LIA | Urea | Motilidad | H2S |
|-------|-----------|----|-----|------|-----------|-----|
| -     | A/A o K/A | +  | +   | d    | +         | -   |

#### **Tolerancia *in vitro* de las bacterias identificadas en tres concentraciones (2, 3 y 6%) de insecticidas Matador y Tamaron**

- Las cepas bacterianas identificadas fueron sembradas en agar nutritivo previamente esterilizado en una autoclave a 121 °C, 15 libras y 15 minutos de tiempo, para la obtención de cultivos puros, luego fueron transferidos 15 ml de medio de cultivo aproximadamente a cada placa Petri.
- Se preparó tubos de Caldo Soya Tripticasa (CST) para realizar el ensayo con microorganismos y concentración de sales biliares 2 g / 30 ml.
- Seguidamente se prepararon tubos de ensayo con 6 ml de CST, los medios de cultivo con insecticidas al 2%, estuvieron compuestos por 95.6 ml de CST, 2.78 ml de sales biliares (SB) y 1.66 ml de insecticida, el medio de cultivo con insecticida al 3% se preparó con 94.4 ml de CST, 2.8 ml de SB y 2.8 ml de insecticida y el medio de cultivo al 6% con 91.7 ml de CST, 2.8 ml de SB y 5.6 ml de insecticida (Figura 20 – Anexos). Los insecticidas Tamaron y Matador lo



expenden en líquido por tanto se midieron en ml (Figura 31 – Anexos).

- A continuación, se preparó diluciones de cada género bacteriano contrastadas con el estándar 0.5 de McFarland, con una densidad aproximada de  $1.5 \times 10^8$  células/ml, un ml de cada dilución fue transferido con las pipetas automáticas hacia tubos con CST.
- Los tubos fueron agitados en un vórtex, luego fueron rotulados e incubados a 37 °C por 24 horas.
- Luego del tiempo establecido, se seleccionaron los tubos de ensayo que presentaron la turbidez en el medio líquido (CST).
- Seguidamente se preparó 9 placas Petri con agar APC, para realizar el recuento bacteriano y se esterilizó en una autoclave.
- Finalmente se sembraron 0.1 ml de los medios líquidos de los tubos de ensayo cultivados que presentaron turbidez, se cultivaron mediante el método de extensión sobre agar APC a 37° C por 24 horas (Figura 21 - Anexos), para luego realizar el conteo de las colonias en cada placa, por cada especie bacteriana y según la concentración de los insecticidas (Figura 22 - Anexos).

#### c. Variables que se analizaron

**Variable independiente:** Concentración de insecticidas (2%, 3% y 6%).

**Variables dependientes:** Recuento de colonias por géneros bacterianos.

#### d. Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis

El diseño experimental fue completo al azar, los tratamientos estuvieron conformados por los tres géneros bacterianos aislados (*Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia*) con tres repeticiones, los recuentos de colonias bacterianas crecidas en medio



de cultivo en placa fueron evaluados mediante pruebas de Kruskal Wallis y de rangos ( $P \leq 0.05$ ), si en caso existiera diferencia estadística significativa (Daniel, 2011), y así se determinó la tolerancia bacteriana a los insecticidas.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 CARGA BACTERIANA DE SUELOS DE LAS LOCALIDADES DE ICHU, JAYLLIHUAYA Y HUERTA HUARAYA

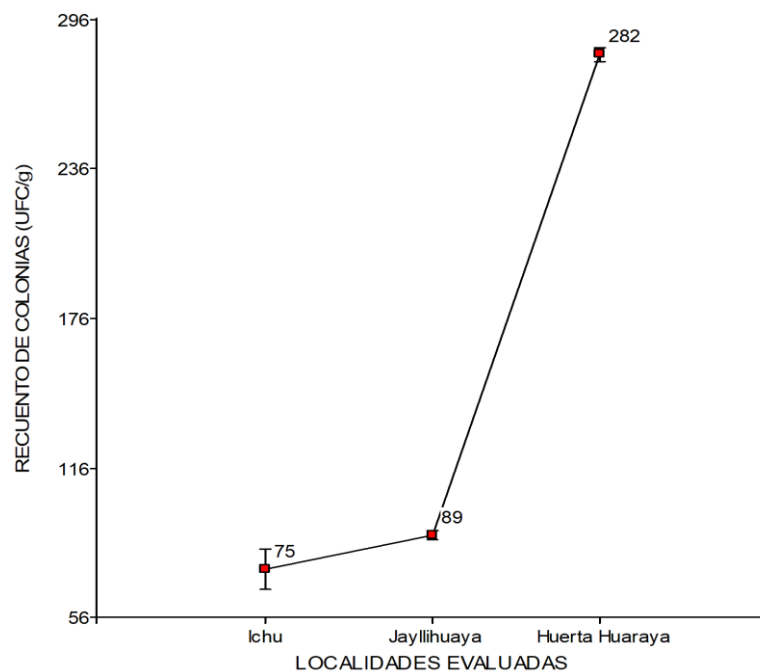
La carga bacteriana presente en las tres localidades de Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya, oscilaron entre los promedios de 52.50 UFC/g en la localidad de Ichu y mes de agosto y 287 UFC/g en la localidad de Huerta Huaraya en los meses de agosto y septiembre. En la localidad de Ichu, los recuentos variaron entre los promedios de 52.59 x 10<sup>3</sup> UFC/g y 97.00 x 10<sup>3</sup> UFC/g en los meses de agosto y septiembre respectivamente, por otro lado, en suelos de la localidad de Jayllihuaya, la carga bacteriana fluctuó entre promedios de 83.00 x 10<sup>3</sup> UFC/g y 91.50 x 10<sup>3</sup> UFC/g en los meses de octubre y agosto respectivamente. A continuación, en la localidad de Huerta Huaraya, los recuentos promedios variaron entre 273 x 10<sup>3</sup> UFC/g y 287 x 10<sup>3</sup> UFC/g en los meses de octubre y agosto. Con respecto a los coeficientes de variabilidad, variaron entre 0.94% y 4.04%, lo cual indica que los valores de recuentos presentaron baja dispersión de datos (Tabla 7).

Según la prueba de Kruskal Wallis, el análisis estadístico mostró que los recuentos de carga bacteriana en las tres localidades de muestreo (Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya), presentaron diferencia estadística significativa ( $H=0.0027$ ;  $g1=2$ ;  $P=0.0027$ ) (Figura 23 – Anexos) y la prueba de rangos, indica que los mayores recuentos se determinaron en suelos de la localidad de Huerta Huaraya, siendo superiores y diferentes a la vez a los recuentos presentados en suelos de Ichu y Jayllihuaya, asimismo, entre estas dos últimas localidades no presentaron diferencia estadística significativa (Figura 5).

**Tabla 7.** Recuentos bacterianos ( $\times 10^3$  UFC/g) en campos de cultivo de tres localidades del distrito de Puno, agosto a octubre 2019.

| Localidades    | Meses     | Repeticiones |     | Prom   | C.V. (%) |
|----------------|-----------|--------------|-----|--------|----------|
|                |           | 1            | 2   |        |          |
| Ichu           | Agosto    | 51           | 54  | 52.50  | 4.04     |
|                | Setiembre | 98           | 96  | 97.00  | 1.46     |
|                | Octubre   | 76           | 75  | 75.50  | 0.94     |
| Jayllihuaya    | Agosto    | 90           | 93  | 91.50  | 2.32     |
|                | Setiembre | 92           | 90  | 91.00  | 1.55     |
|                | Octubre   | 82           | 86  | 84.00  | 3.37     |
| Huerta Huaraya | Agosto    | 289          | 285 | 287.00 | 0.99     |
|                | Setiembre | 288          | 286 | 287.00 | 0.49     |
|                | Octubre   | 271          | 275 | 273.00 | 1.04     |

**Donde:** Rep = repeticiones; C.V. = coeficiente de variación; Prom = promedio



**Figura 5.** Promedio de recuentos bacterianos en suelos de tres localidades de muestreo, agosto y noviembre 2019.

Al mismo tiempo, los recuentos bacterianos comparados entre los meses, la



prueba de Kruskal Wallis, mostró que no existió diferencia estadística significativa ( $H=2.32$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.3133$ ) (Figura 24 – Anexos), pero el mayor promedio de recuento bacteriano se determinó en el mes de septiembre, luego en octubre y finalmente en el mes de agosto.

Un aspecto muy importante que no considera en los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo (Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM), son los recuentos bacterianos, razón por la cual no se contrastó para determinar la calidad de los suelos evaluados. Al respecto contrastando con Calvo *et al.* (2008), manifiestan recuentos de  $13.5 \times 10^6$  UFC/g a  $71.4 \times 10^6$  UFC/g de bacterias totales en suelos de papas variedades amarilla y peruanita respectivamente, donde los parámetros tipo de suelo (franco arenoso), contenido de materia orgánica, pH y fósforo disponible, son los factores más importantes relacionados con la fisiología bacteriana, ante ellos los suelos evaluados tendrían una calidad bacteriana baja con respecto a los de otros autores, por lo que no son óptimos para el cultivo.

Los recuentos obtenidos en la investigación fueron inferiores a los mencionados por Armado *et al.* (2018), quienes en suelos con actividad metalúrgica (Cojedes – Venezuela), reportan promedios de cargas bacterianas de  $6.65 \times 10^5$  UFC/g en época lluviosa y de  $1.73 \times 10^5$  UFC/g en época de sequía, a los reportados por Silberman (2016), quien en sistemas silvopastoriles (Chaqueña – Argentina), presentaron recuentos de bacterias heterótrofas aerobias entre 794,328 UFC/g en verano a 1'584,893 UFC/g de suelo en invierno, a los registrados por Calvo *et al.* (2008), quienes en la rizósfera del cultivo de papa en zonas altoandinas del Perú, mencionan recuentos de bacterias de  $10^6$  y  $10^8$  UFC/g, asimismo, fueron inferiores a los reportados por Bernal *et al.* (2006), quienes





en suelos de Zipaquirá (Colombia), encontraron cifras de  $21'877,616$  UFC/g de suelo, por otro lado, fueron también inferiores a los recuentos obtenidos por Sivila de Cary y Angulo (2006), en suelos del altiplano boliviano con  $11'481,536$  UFC/g para poblaciones bacterianas y a los señalados por Diánez (2005), con recuentos bacterianos de  $601.76 - 1470.15 \times 10^6$  UFC/g de suelo.

Los bajos recuentos bacterianos y los microbianos en general, están influidos por los parámetros fisicoquímicos del suelo, como la elevada acidez, el bajo pH y el exceso de hierro (Reyes y Valery, 2007), asimismo, la comunidad edáfica depende de nutrientes existentes en el ecosistema, ya que son considerados como el principal agente convertidor de los nutrientes a través del suelo y producen compuestos útiles para las plantas en los ciclos biogeoquímicos (Duxbury *et al.*, 1989), lo que concuerda con los recuentos de bacterias diazotróficas en suelos de las provincias de El Collao y Puno (Perú) al poseer las características de materia orgánica de 0.95% y 2.15%, nitrógeno total entre 0.04% y 0.06%, pH de 6.30 y 7.80, conductividad eléctrica entre 0.11 mS/cm y 0.16 mS/cm, fósforo de 2.51 ppm y 3.63 ppm y potasio entre 38 ppm y 64 ppm (Escalante, 2018), por lo tanto, se debe mantener la humedad y la temperatura tal como se presenta en verano (Montaño *et al.*, 2013) y la oxigenación de los suelos, siendo los parámetros más esenciales para la proliferación bacteriana.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la investigación, fueron superiores a los mencionados por Beltrán (2014), quien en suelos cultivados con papa en Boyacá (Colombia), encontró recuentos bacterianos entre 416 y 4897 UFC/g, asimismo, a los resultados obtenidos por Pérez (2014a), quien en un suelo arenado en Almería (España), obtuvieron recuentos de bacterias entre  $0.1 - 23.0 \times 10^2$  UFC/g de suelo y a los



mencionados por Romero *et al.* (2009), quienes en suelos de Boyacá (Cundinamarca – Colombia), citan recuentos bacterianos de  $83 \times 10^2$  UFC/g a  $1.32 \times 10^5$  UFC/g.

Los mayores recuentos bacterianos en muestras de tierra de suelos de la localidad de Huerta Huaraya, se debería al uso de abonos como estiércoles de diversos animales, tales como aves, guano de isla y ovinos, con una disminuida aplicación de insecticidas y fertilizantes químicos (Escalante, 2018), tal como nos respondió algunas personas de la zona mediante comunicación personal y la presencia de materia orgánica, origina la germinación y crecimiento de semillas, las cuales originan un ambiente en el cual las raíces liberan sustancias a base de carbohidratos que nutren a las bacterias, incrementando así la carga bacteriana en la rizósfera (Atlas y Bartha, 2002). Por otro lado, los recuentos obtenidos en la investigación fueron inferiores a los obtenidos por otros investigadores, debiendo probablemente a que los suelos poseerían altos niveles de NaCl (Ogata y Zúñiga, 2008), producto del exagerado uso de agroquímicos, originando la pérdida de turgencia de las células de las raíces, originando sequedad fisiológica de las plantas y en consecuencia los bajos recuentos bacterianos (Pernasetti, 2010).

Otro factor muy importante que influyen en la biomasa bacteriana presente en los suelos, se constituye la humedad del suelo, tal como lo menciona Jadin y Jacquemart (1978), quien en suelos con riego por goteo, acelera la tasa de desarrollo de las plantas y por tanto atrae a las bacterias, por otro lado, Ormeño y Ovalle (2011) manifiestan que la presencia de abono como el humus líquido es fuente de nutrientes para las plantas y así se mejora la calidad química de los suelos, dichas condiciones preservan y fomentan la diversidad bacteriana en la rizósfera. El pH es otro factor que influyen, tal como lo manifiesta Arguello *et al.* (2016), quienes encontraron que valores de pH de 6.48



unidades, ligeramente ácido, ideal para la proliferación bacteriana, asimismo, Dalton y Kramer (2006), indican la presencia de gramíneas (*Brachiaria* sp), favorecería el incremento de los recuentos de bacterias aerobias y microaerófilas, debido a que poseen un buen crecimiento radical y a cambio las bacterias otorgan nitratos para su nutrición, lo cual es reafirmado por Calvo *et al.* (2008), quienes indican que la alteración del pH del suelo, podría inactivar las enzimas microbianas, y al actuar la disponibilidad o fijación de minerales nutritivos afectaría las densidades bacterianas en los suelos.

Desde el punto de vista ecológico, las bacterias son beneficiosas debido a que contribuyen al reciclaje de nutrientes de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006), y muchas de las bacterias entre ellas las diazótrofes sintetizan hormonas vegetales como las citoquininas, las auxinas y giberelinas (Cárdenas *et al.*, 2010); en contraste los bajos recuentos bacterianos en las muestras de suelo son afectados por las condiciones del suelo, los tipos de vegetación y la temporada climática tal como lo afirma Melloni *et al.* (2004), sin embargo, según Ferrari *et al.* (2005), un suelo de un campo de cultivo, posee una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, éstos originarían el establecimiento de diferentes grupos microbianos, así también lo afirma Hashimoto *et al.* (2006), entre ellos predominan microorganismos oligótrofos, que descomponen la materia orgánica y originan la dinámica de nutrientes.

Mantilla *et al.* (2000), por su parte, afirma que la composición, la clase y el contenido de materia orgánica, así como los factores ambientales (clima, posición geográfica, temperatura, uso del suelo, entre otros) y factores edáficos (humedad, temperatura, pH y aireación) originaría la variabilidad microbiana, a su vez, Scholer *et al.* (2003), adiciona que un recuento bacteriano dependería de la vegetación, la



temporada, el contenido de humedad, el tipo de suelo, el tipo de labranza, la fertilización, el suministro de oxígeno, el pH y la temperatura, a dichos factores, Taylor *et al.* (2002) sugieren también las elevadas contenidos de aluminio y la disponibilidad de nutrientes microbianos.

Después de todo lo analizado con respecto a los resultados obtenidos en el primer objetivo, se rechaza la hipótesis planteada ( $H_a$ ), debido a que los recuentos bacterianos de muestras de suelo de los tres campos de cultivo de las localidades de Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya no fueron superiores a  $10^8$  UFC/g de suelo.



## 4.2 TOLERANCIA A LOS INSECTICIDAS MATADOR Y TAMARON EN BACTERIAS

### 4.2.1 Tolerancia bacteriana al insecticida Matador

La cepa *Pseudomonas* sp, resultó con la disminución del número de colonias al incrementar la concentración del insecticida Matador con promedios de 223.33 UFC a 100.00 UFC, a concentraciones de 2% y 3% respectivamente. Los coeficientes de variabilidad (CV) oscilaron entre 5.04% a 10% frente al insecticida Matador, indicando dispersión de datos leve. A continuación, la cepa *Bacillus* sp presentó la disminución del número de colonias al acrecentar la concentración del insecticida Matador desde promedios de 290 UFC a 253.33 UFC, a concentraciones de 2% y 6% respectivamente. Los CV oscilaron entre 3.45% a 9.80% frente al insecticida Matador, indicando dispersión de datos leve. Mientras tanto, la cepa *Serratia* sp, resultó con la reducción del número de colonias al incrementar la concentración del insecticida Matador desde 233.33 UFC a 143.33 UFC, a concentraciones de 3% y 6% respectivamente. Los CV oscilaron entre 9.61% a 13.09% frente al insecticida Matador, indicando dispersión de datos leve (Tabla 8).

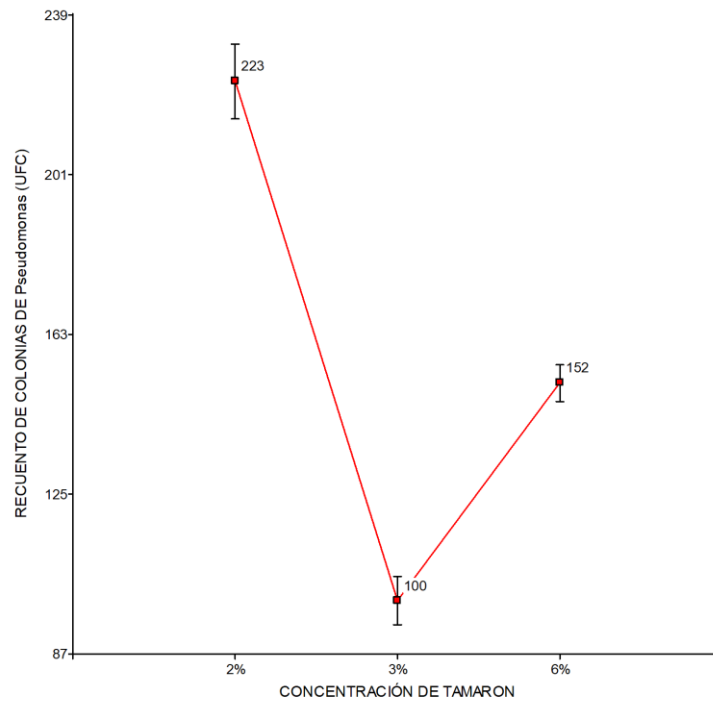
Según la prueba de Kruskal Wallis, el análisis estadístico mostró que los recuentos de colonias de *Pseudomonas* sp frente a tres concentraciones del insecticida Matador, presentaron diferencia estadística significativa ( $H=7.20$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0036$ ), ya que el valor P resultó menor al nivel de significancia 0.05 (Figura 25 – Anexos), siendo mayores los recuentos de colonias a concentraciones de 2%, seguidos de 6% y 3% respectivamente (Figura 6); sin embargo, los recuentos de colonias de *Bacillus* sp frente a tres

concentraciones de Matador, no presentaron diferencia estadística significativa ( $H=3.76$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.1679$ ), ya que el valor P no resultó mayor al nivel de significancia 0.05 (Figura 26 – Anexos), pero la tendencia fue a la disminución del recuento de colonias (Figura 7). Asimismo, la prueba de Kruskal Wallis mostró que los recuentos de colonias de *Serratia* sp frente a tres concentraciones de Matador, presentaron diferencia estadística significativa ( $H=5.60$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0464$ ), ya que el valor P resultó menor al nivel de significancia 0.05 (Figura 27 – Anexos), siendo mayores los recuentos de colonias a concentraciones de 3%, seguidos de 2% y 6% respectivamente (Figura 8).

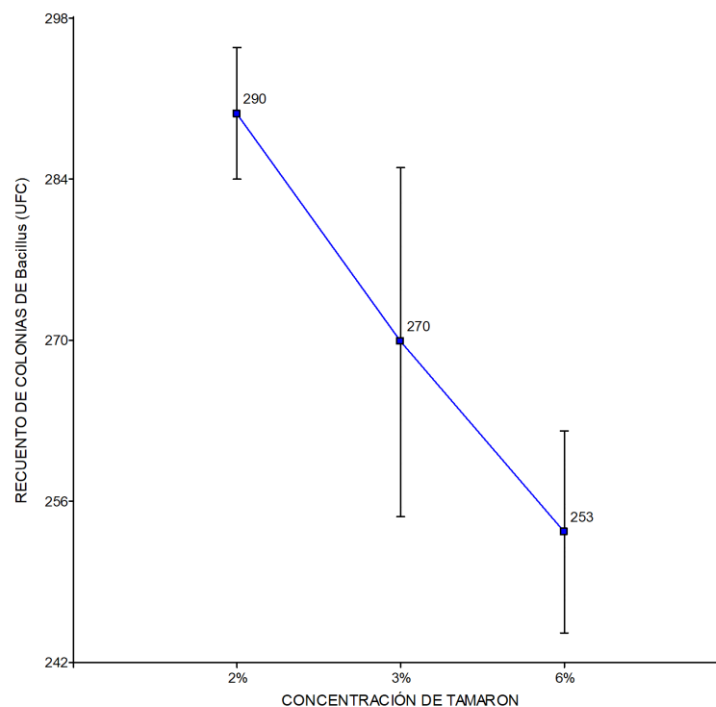
**Tabla 8.** Tolerancia bacteriana a concentraciones del insecticida Matador según el recuento de colonias bacterianas (UFC), agosto a octubre 2019.

| Cepas bacterianas  | Concentraciones (%) | Repeticiones |     |     | Prom   | CV (%) |
|--------------------|---------------------|--------------|-----|-----|--------|--------|
|                    |                     | 1            | 2   | 3   |        |        |
| <i>Pseudomonas</i> | 2                   | 210          | 240 | 220 | 223.33 | 6.84   |
|                    | 3                   | 90           | 100 | 110 | 100.00 | 10.00  |
|                    | 6                   | 150          | 145 | 160 | 151.67 | 5.04   |
| <i>Bacillus</i>    | 2                   | 290          | 300 | 280 | 290.00 | 3.45   |
|                    | 3                   | 300          | 250 | 260 | 270.00 | 9.80   |
|                    | 6                   | 250          | 270 | 240 | 253.33 | 6.03   |
| <i>Serratia</i>    | 2                   | 240          | 200 | 210 | 216.67 | 9.61   |
|                    | 3                   | 200          | 260 | 240 | 233.33 | 13.09  |
|                    | 6                   | 140          | 160 | 130 | 143.33 | 10.66  |

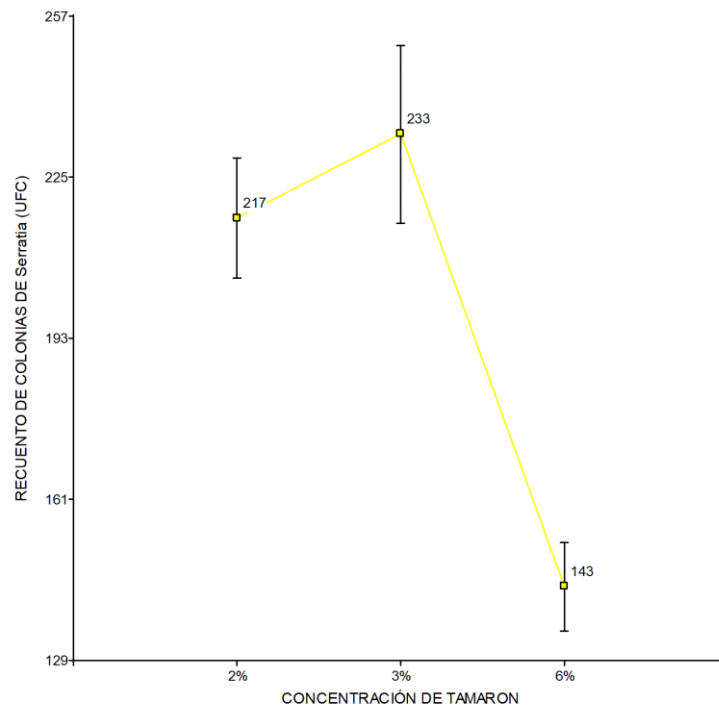
**Donde:** Prom = promedio; CV = coeficiente de variación



**Figura 6.** Promedios de recuentos de colonias de *Pseudomonas* sp frente a tres concentraciones del insecticida Matador.



**Figura 7.** Promedios de recuentos de colonias de *Bacillus* sp frente a tres concentraciones del insecticida Matador.



**Figura 8.** Promedios de recuentos de colonias de *Serratia* sp frente a tres concentraciones del insecticida Matador.

#### 4.2.2 Tolerancia bacteriana al insecticida Tamaron

En la Tabla 9, se visualiza que la cepa *Pseudomonas* sp, resultó con un incremento del recuento de colonias de 255 UFC a 298.33 UFC, frente a concentraciones de 2% y 6% respectivamente. Por lo observado, se afirma que *Pseudomonas* sp toleraría mejor a Tamaron que a Matador. Los coeficientes de variabilidad (CV) fluctuaron entre 2.56% y 32.78%, indicando dispersión de datos moderada. La cepa *Bacillus* sp, se presentó con la disminución del número de colonias al acrecentar la concentración del insecticida Tamaron, de 320 UFC a 256.67 UFC frente a concentraciones de 3% y 6% respectivamente. Por lo observado, se afirma que *Bacillus* sp toleraría de forma similar a Tamaron y a Matador. Los CV frente a Tamaron fluctuaron entre 6.54% y 25.94%, indicando dispersión de datos moderada. La cepa *Serratia* sp, resultó con la reducción del número de colonias al incrementar la concentración del insecticida Tamaron, con cifras



entre 233.33 UFC a 46.67 UFC, frente a concentraciones de 3% y 6% respectivamente. Por lo observado, se afirma que *Serratia* sp toleraría a Tamaron y a Matador, hasta una concentración de 3%, luego se observan disminuciones notorias en los recuentos de colonias a una concentración de 6% de los insecticidas. Los CV frente a Tamaron fluctuaron entre 13.09% y 32.73%, indicando dispersión de datos moderada.

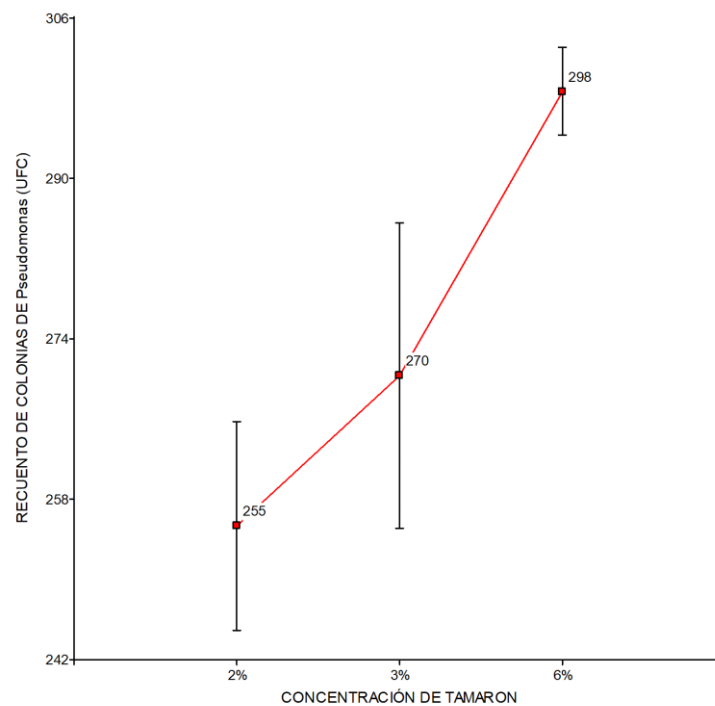
**Tabla 9.** Tolerancia bacteriana a concentraciones del insecticida Tamaron según el recuento de colonias bacterianas (UFC), agosto a octubre 2019.

| Cepas bacterianas  | Concentraciones (%) | Repeticiones |     |     | Prom   | CV (%) |
|--------------------|---------------------|--------------|-----|-----|--------|--------|
|                    |                     | 1            | 2   | 3   |        |        |
| <i>Pseudomonas</i> | 2                   | 235          | 260 | 270 | 255.00 | 32.78  |
|                    | 3                   | 240          | 280 | 290 | 270.00 | 9.80   |
|                    | 6                   | 305          | 290 | 300 | 298.33 | 2.56   |
| <i>Bacillus</i>    | 2                   | 250          | 270 | 285 | 268.33 | 6.54   |
|                    | 3                   | 350          | 300 | 310 | 320.00 | 8.27   |
|                    | 6                   | 180          | 290 | 300 | 256.67 | 25.94  |
| <i>Serratia</i>    | 2                   | 159          | 150 | 200 | 169.67 | 15.71  |
|                    | 3                   | 200          | 240 | 260 | 233.33 | 13.09  |
|                    | 6                   | 60           | 50  | 30  | 46.67  | 32.73  |

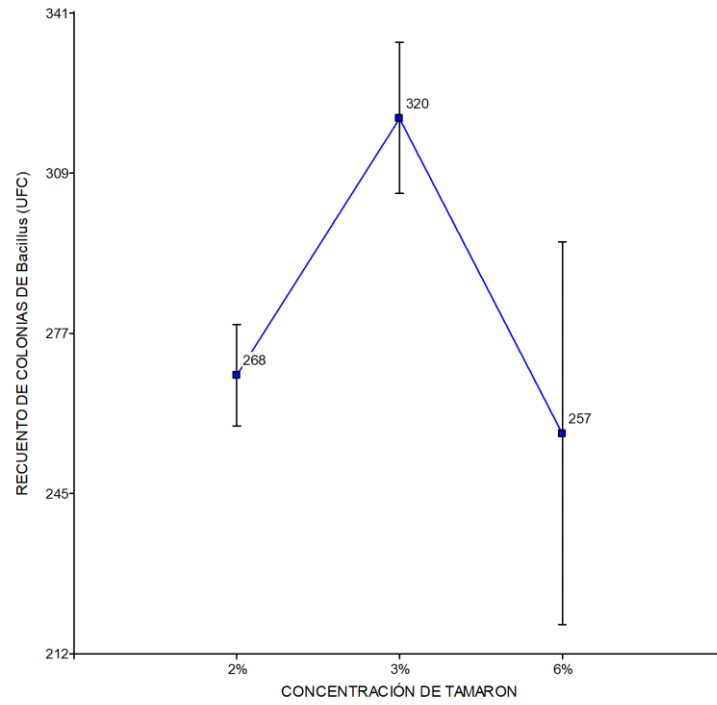
**Donde:** Prom = promedio; CV = coeficiente de variación

Según la prueba de Kruskal Wallis, el análisis estadístico mostró que los recuentos de colonias de *Pseudomonas* sp frente a tres concentraciones del insecticida Tamaron, presentaron diferencia estadística significativa ( $H=5.49$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0464$ ), ya que el valor P resultó menor al nivel de significancia 0.05 (Figura 28 – Anexos), siendo mayores los recuentos de colonias a concentraciones de 6%, seguidos de 3% y 2% respectivamente (Figura 9); sin embargo, los recuentos de colonias de *Bacillus* sp frente a tres concentraciones de Tamaron, no presentaron diferencia estadística significativa ( $H=5.09$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0690$ ), ya que el valor P resultó mayor al nivel de significancia 0.05 (Figura 29

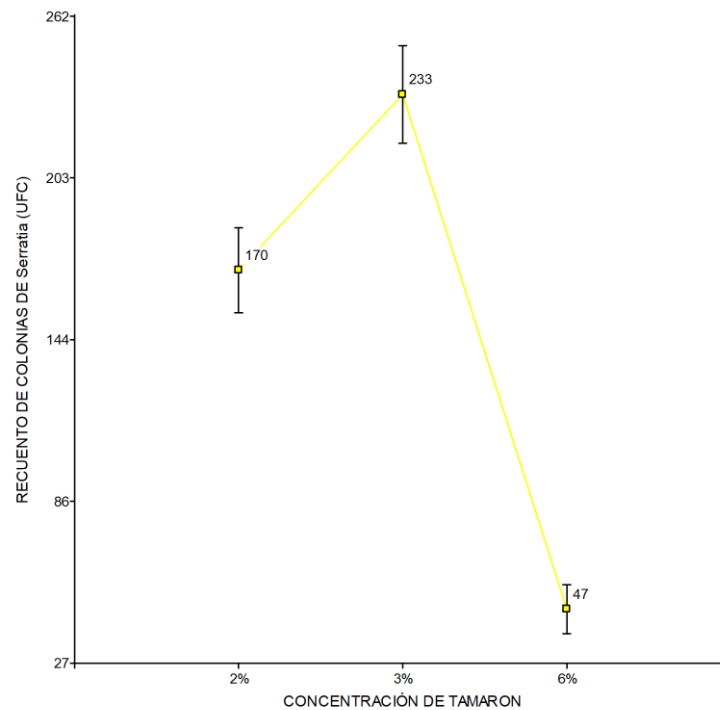
– Anexos), pero la tendencia fue a la disminución del recuento de colonias (Figura 10). Asimismo, la prueba de Kruskal Wallis mostró que los recuentos de colonias de *Serratia* sp frente a tres concentraciones de Tamaron, presentaron diferencia estadística significativa ( $H=6.82$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0071$ ), ya que el valor P resultó menor al nivel de significancia 0.05 (Figura 30 – Anexos), siendo mayores los recuentos de colonias a concentraciones de 3%, seguidos de 2% y 6% respectivamente (Figura 11).



**Figura 9.** Promedios de recuentos de colonias de *Pseudomonas* sp frente a tres concentraciones del insecticida Tamaron.



**Figura 10.** Promedios de recuentos de colonias de *Bacillus* sp frente a tres concentraciones del insecticida Tamaron.



**Figura 11.** Promedios de recuentos de colonias de *Serratia* sp frente a tres concentraciones del insecticida Tamaron.



En la investigación, se determinó que bacterias del género *Bacillus* sp, fueron las que presentaron mayores promedios de recuentos de colonias frente al insecticida Matador en las tres concentraciones, siendo similar en Tamarón, excepto en la concentración de 6% donde fue superada por *Pseudomonas* sp, por tanto, se afirma que los géneros más tolerantes a los dos insecticidas y si toleran tendrían la potencialidad de degradar a los insecticidas, tal como lo menciona Mendía (2020), quien, en Ecuador, en campos de cultivo de papa fumigados con 103 ppm de malatión residual, *Bacillus cereus* logró degradar el 42.99%, asimismo, Valdivieso (2019), en Ecuador a concentraciones de 800 y 1600 ppm, *Bacillus cereus* degradó el 96% del insecticida organofosforado LORSBAN 480 luego de 30 días y el 73% fue degradado por *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas* sp, por otro lado, Kopytko *et al.* (2017), en Colombia, cepas de *Bacillus* sp, aplicadas en concentraciones de  $10^8$  UFC/ml, removieron DDT (diclorodifeniltricloroetano), DDD (diclorodifenildicloroetano) y DDE (diclorodifenildicloroetileno) en 56.2%, 17.1% y 44.5% respectivamente en 20 días, a su vez Marín y Jaramillo (2015), en suelos de Córdova (Colombia), con 272.9 y 1793.3 mg/kg de demeton – metilsulfón, la bacteria nativas *Bacillus* sp degradó el 73.5% de clorpirifos.

En ese sentido, las bacterias nativas aisladas en los suelos donde se aplican insecticidas, serían útiles para los procesos de biorremediación, debido a que las bacterias de los géneros *Serratia*, *Bacillus* y *Pseudomonas* transforman el plaguicida clorpirifós a compuestos simples y disminuyen su toxicidad, ya que poseen un metabolismo fisiológico capaz de degradarlos, pero dependerá de la biodisponibilidad, del pH, la temperatura y el tipo de suelo, parámetros no controlados en la investigación y la concentración del organofosforado (Hernández *et al.*, 2017), por otra parte, Calle y Ode



(2014), en los valles del río Apurímac, Ene y Mantaro (Perú) se vienen aplicando muchas bacterias entre ellas *Bacillus* sp, en cultivos de *Erythroxylum coca* (coca) y *Theobroma cacao* (cacao), lográndose la biodegradación bacteriana de Carbofurén y así lograr su biorremediación, Sánchez y Henry (2012), en Santa Marta (Colombia), manifestaron que *Bacillus licheniformis* logró tolerar y degradar en condiciones aerobios el 24% de Aldrín persistentes en Santa Marta (Colombia).

La gran diversidad microbiana existente y no estudiada por completo en los suelos del distrito de Puno, origina la necesidad de realizar aislamientos e identificaciones entre bacterias y hongos, los cuales al tener la potencialidad de tolerar y a su vez degradar a otros insecticidas serían utilizados para biorremediar suelos con altos niveles de insecticidas, tal como lo menciona Mireles *et al.* (2018), quienes en México, aislaron organismos Firmicutes y Actinomycetes, y el 63% toleraron al insecticida Imidacloprid, inclusive degradaron al insecticida disminuyendo su toxicidad y efectos en el medio ambiente. En la investigación se determinó que *Serratia* sp presentó una tolerancia menor a *Bacillus* sp, lo cual viene corroborada por Rodríguez (2018), quien en el distrito de Moche (Trujillo – Perú), demostró que *Serratia marcescens* en suelos con 62.98 ppm de Malathion y una concentración bacteriana inicial de  $10^8$  UFC/ml obtuvo como máxima degradación de 12.53% al día tres de experimentación, la cual resultó muy baja al igual que la tolerancia reportada en la investigación, por lo que se asume que mucho tiene que ver la genética bacteriana y los genes que poseen para sintetizar proteínas con características enzimáticas, que degradan a los diversos xenobióticos puestos en contacto.

Por otro lado, las bacterias poseen la capacidad de tolerar altas concentraciones de insecticidas, así lo demostraron Oviedo y Díaz (2017), quienes a concentraciones de



1000 ppm de Atrazina, fueron toleradas por cepas nativas de *Pseudomonas* sp, *Streptomyces* sp y *Arthrobacterium* sp, en condiciones de 37 °C y el pH de 6 – 9 unidades, asimismo, Jaramillo *et al.* (2016), en suelos de Cartagena de Indias (Bolívar – Colombia), determinar que bacterias de la familia Enterobacteriaceae, degradaron insecticidas organofosforados en concentraciones de 200 ppm y 30 días de tratamiento, dicha capacidad se debería a procesos metabólicos hidrolíticos que posee cada bacteria independientemente, tal como lo señala Castellanos (2016), quien determinó la biodegradación de N-metilcarbamatos, por vía hidrolítica, en bacterias *Sphingomonas* sp. y *Novoshingobium* sp, muchas especies llegando a degradar el 100% del insecticida, tal como lo reporta Pérez (2014b), quien en Imbabura (Inanbura), encontró que las bacterias *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp y *Arthrobacter* sp, biodegradaron el 100% del insecticida Cleaner.

En las tiendas agropecuarias donde se expenden diversos productos agroquímicos, entre ellos herbicidas, insecticidas, entre otros, los cuales no solo originarían mortandad de las plantas (mala hierbas) o insectos plagas blanco, sino también traería consigo la muerte de otros seres vivos originando la ruptura de cadenas alimenticias, siendo esto perjudicial para el normal desarrollo de las especies en los ecosistemas terrestres y acuáticos, es que se realizan este tipo de investigaciones para determinar si existen bacterias capaces de tolerar y degradar a la gran inmensidad de insecticidas, entre ellos se mencionan a Tirado *et al.* (2014), quienes determinaron que las especies bacterianas *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas aeruginosa*, degradaron el plaguicida tóxico para la salud humana y el medio ambiente denominado Monocrotofós, por otro lado, Quinchía *et al.* (2006), determinaron que *Pseudomonas* sp toleró y degradó concentraciones de 480 ppm, 4,800 ppm, 2,4000 ppm y 48,000 ppm del insecticida



Lorsban 4EC en Antioquía (Colombia). En Veracruz (México), Hernández *et al.* (2005), aislaron 10 bacterias desde los nódulos de *Desmodium tortuosum*, que luego de ser sometidas a Malatión, disminuyeron su concentración y produjeron productos intermedios de baja toxicidad como ácidos S-trimetil fosfotioico y Strimetil fosforoditioico, dimetil ester y ácido tiofenil carboxílico, siendo este el resultado final de aplicación de bacterias degradadoras de insecticidas en los suelos.

Según Betancur *et al.* (2013), afirma que las bacterias presentes o establecidas en ambientes contaminados con compuestos xenobióticos, poseen una tendencia a evolucionar hasta lograr la degradación, muchos de estos procesos son limitados y llevan a cabo a baja velocidad relativa, ante ello, Singh *et al.* (2008), sugiere que se debe de mejorar la actividad catalítica y la especificidad enzimática en los microorganismos, para ello recomienda realizar técnicas de ingeniería genética como la mutagénesis de sitio dirigida o *error-prone PCR*. Si se tuviera un buen conocimiento sobre la fisiología y genética de bacterias relacionadas a procesos de biorremediación, sería útil para evaluar y optimizar la descontaminación, tal como lo afirma Watanabe (2001).

La potencialidad que poseen las bacterias en la tolerancia y ulterior degradación de insecticidas, sería viable ante una gran diversidad genética microbiana, pero ante ello se tiene la dificultad de que muchas de ellas no pueden ser cultivadas mediante técnicas convencionales de aislamiento en un laboratorio, así lo mencionan Iwamoto y Nasu (2001), por otro lado, a pesar de que entre bacterias existe la llamada transferencia genética horizontal, Furukawa y Miyazaki (1986), clonaron genes del catabolismo de bifenil policlorados desde el cromosoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, por otro lado, Toop *et al.* (1993), encontraron en bacterias ER2 y *Achromobacter* sp, un perfil



de plásmidos muy similares y ahí determinaron la presencia del gen *mcd*, que codifica o expresa la formación de la enzima carbofuran hidrolasa, degradadora del Carbofuran, otras investigaciones como las de Erickson y Mondello (1992), secuenciaron nucleótidos del gen que codifica a la enzima bifenil dioxygenasa de una cepa del género *Pseudomonas*, que posee un potencial valioso en la biorremediación ambiental, estos y otros avances científicos se vienen desarrollando mediante técnicas de Biología Molecular (PCR cuantitativa en tiempo real, PCR transcripción reversa, hibridación *southern blot*, entre otros), el cual sirve para identificar y monitorear bacterias, genes catabólicos relacionados con la degradación de compuestos xenobióticos (Marzorati *et al.*, 2010).

Finalmente, Maya *et al.* (2012), mencionan que los microorganismos poseen la capacidad de degradar al Clorpirifós o cp a 3,5,6-tricloro-2-piridinol o tcp (metabolito primario del Clorpirifós), por efecto del ácido pirúvico producto de la glucólisis y antes que ingrese al ciclo de Krebs, produciendo como productos de ese metabolismo al CO<sub>2</sub> y agua y si en caso no sería degradado se acumularía y suprimiría el crecimiento bacteriano, por tanto la degradación sería obstaculizada a través de la represión catabólica, tal como lo mencionan Silambarasan y Abraham (2012).

Después de todo lo analizado con respecto a los resultados obtenidos en el segundo objetivo, se acepta la hipótesis planteada (Ha), debido a que la tolerancia a los insecticidas Matador y Tamaron en tres concentraciones varían según las especies de bacterias previamente aisladas y en este caso bacterias del género *Bacillus* sp presentaron mejores tolerantes a los insecticidas experimentados.





## V. CONCLUSIONES

- La carga bacteriana de suelos de tres campos de cultivo de las localidades de Ichu, Jayllihuaya y Huerta Huaraya, fueron 51 UFC/g y 98 UFC/g en los meses de agosto y setiembre, entre 82 UFC/g y 93 UFC/g en los meses de octubre y agosto y entre 271 UFC/g y 289 UFC/g en los meses de octubre y agosto.
- La tolerancia a los insecticidas Matador y Tamarón se presentó en los tres géneros bacterianos (*Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Serratia* sp), debido al crecimiento de colonias en los medios de cultivo APC suplementado con concentraciones de 2%, 3% y 6% de los insecticidas, los mejores promedios de recuentos de colonias se registró en bacterias del género *Bacillus* sp con 253.33 UFC, 270.00 UFC y 290.00 UFC, respectivamente frente al insecticida Matador; de similar forma *Bacillus* sp presentó los mayores promedios de colonias a concentraciones de 2% y 3% de Tamarón con promedios de 268.33 y 320.00 UFC, respectivamente, y al 6% de Tamarón, los mayores promedios se obtuvo en *Pseudomonas* sp con 298.00 UFC.



## VI. RECOMENDACIONES

- Identificar mediante pruebas moleculares especies de bacterias presentes en los suelos del Altiplano Peruano, y determinar su tolerancia a diferentes insecticidas que se expenden en las tiendas agropecuarias.
- Determinar parámetros de conductividad eléctrica, salinidad, pH, contenido de materia orgánica, entre otros parámetros para determinar la calidad de los suelos ya que se encuentran relacionados con la presencia de especies y recuentos bacterianos del altiplano peruano.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, M. y Y. Mekuria 1991. Organophosphate pesticide poisoning in 50 Ethiopian patients. *Ethiopian Medical Journal*. 1991. 29:3, 109-118.
- ADAMA. (2020). Matador: Metomilo. Ficha técnica de productos fitosanitarios. Página web:  
[https://publicwebsite.adama.com/documents/466793/470082/ficha\\_tecnica\\_matador90\\_adama\\_tcm43-17165.pdf](https://publicwebsite.adama.com/documents/466793/470082/ficha_tecnica_matador90_adama_tcm43-17165.pdf)
- Aguirre, J., S. Narváez-González, M. Bernal-Vera y E. Castaño-Ramírez, 2014. Contaminación de operarios con clorpirifos, por práctica de «embolsado» de banano (*Musa sp.*) en Urabá, Antioquia. *Revista Luna Azul* 38:191-217.
- Álvarez. N, Hernández. G, y Ríos. L. (2017). Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. *Corpoica, Ciencia Tecnología Agropecuaria*, Mosquera, Colombia, 18(1):139-159 ISSN 0122- 8706 ISSN: 2500-5308. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n1/v18n1a09.pdf>.
- Argüello, A., Madiedo N. y Moreno L. (2016). Cuantificación de bacterias diazótrofes aisladas de suelos cacaoteros (*Theobroma cacao L.*), por la técnica de número más probable (NMP). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XVIII (2): 40-47.
- Armado, A., Pérez J., Durán D., Reyes D., Medina M., y Valbuena O. (2018). Efectos sobre parámetros bioquímicos y biológicos bacteriano en suelos que contiene concentraciones permisibles de metales. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 34 (3), 441-451. DOI: 10.20937/RICA.2018.34.03.07.
- Artiles, L., Otero, J., y Barrios, I. (2008). Metodología de la Investigación para las Ciencias de la Salud. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 341 p.
- Atlas M. y Bartha R. (2002). *Ecología Microbiana y microbiología ambiental*. Cuarta Edición. Addison Wesley. Nueva York – USA.



- Atrevi, H., Smith N., y Chaudhry Q. (2002). Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments. En: Pesticide Outlook. 2002. DOI 10.1039/b200937b.
- Bano, N., y Musarrat, J. (2004). Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. FEMS Microbiology Letters. Vol. 231 (1): 13–17.
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. Ecological Economics. 64 (2): 269-285.
- Bashan, Y., Holguin, G., y De Bashan, L. (2004). *Azospirillum* - plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. Can. J. Microbiol, 50, 521.
- Beltrán, M. (2014). Estudio comparativo de poblaciones microbianas totales y solubilizadoras de fosfato en suelo de páramo cultivados con papa (*Solanum tuberosum*) en Ventaquemada – Boyacá. Revista Investigación Innovación e Ingeniería, Facultad de Ciencias e Ingeniería, (2), 56-74.
- Benavidez, G., y García, A. (1997). Salud laboral. conceptos y técnicas para la prevención de riesgos laborales. Masson.
- Bernal, E., Celis, S., Galindez, X., Moratto, C., Sanchez, J. y García, D. (2006) Microflora cultivable y endomicorrizas obtenidas en hojarasca de bosque (páramo Guerrero - finca puente de tierra) Zipaquirá, Colombia. *Acta biol.Colomb*, 11(2), 125-130.
- Betancur, B., Pino, N., Peñuela G. y Gardona S. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: caso DDT. Revista Gestión y Ambiente, 16 (3), 119-135.
- Bird, B., Sutherland D., Gresham C., Oakeshott J., Scott C. y Eddleston M. (2008). OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning



- with highly toxic organophosphorus pesticides. *Toxicol.* 247 (2): 88-92.
- Bravo, V., T. Rodríguez, B. van Wendel, N. Canto, G. R. Calderón, M. Turcios, L. A. Menéndez, W. Mejía, A. Tatis, F. Z. Abrego, E. de la Cruz, and C. Wesseling. 2011. Monitoring pesticide use and associated health hazards in Central America. *Int. J. Occup. Environ. Health* 17(3):258-269.
- Brutti, L., Beltrán M. y García de Salamone I. (2018). Biorremediación de los recursos naturales. Colección Recursos. INTA Ediciones. Ministerio de Agroindustria. Buenos Aires – Argentina. 492 p.
- Calle, R. y Ode F. (2014). Biodegradación de carbofurán por bacterias aisladas de suelos agrícolas del distrito Santa Rosa del Valle Río Apurímac, Ene y Mantaro. Tesis de Biólogo Microbiólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú. 98 p.
- Calvo, P., Meneses, L. y Zuñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología aplicada*, 7(1,2), 141-148.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). (2020). Estadísticas. <http://www.casafe.org/biblioteca/estadisticas>.
- Cárdenas, D., Garrido, M., Bonilla, R., y Baldani, V. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*. 33 (3): 11.
- Casal, J. y Mateu E. (2003). Tipos de muestreo. *Rev. Epidem. Med. Prev.* 1: 3 – 7.
- Castellanos, J., Galvis J., y Carreño, A. (2016). Biodegradación de carbofuran y carbaril por *Sphingomonas* sp., S8-M3-13. *Agronomía & Ambiente*, 36 (1), 45-52.
- Chaudhry, G. R y Ali, A. N. 1988. Bacterial metabolism of carbofuran. *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (6): 1414-1419.



- Cheng, C., De Frank J. y Rastogi V. (1999). *Alteromonas prolidase* for organophosphorus G-agent decontamination. *Chem Biol Interact.* 119: 455-462.
- Cole, C., McConnell R., Murray D. y Pacheco F. (1988). *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 198: 105:3, 231-244.
- Corrales, L., Sánchez L., Arévalo Z. y Moreno V. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *Rev. NOVA.* 12 (21): 165 – 178.
- Dalton, A. y Kramer S. (2006). Plant – Associated Bacteria, p. 105-130. *In* S. S. Gnanamanickam (ed.). *Nitrogenfixing bacteria in non – legumes.* Springer, Dordrecht, Holanda.
- Daniel, W. (2011). *Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud.* Editorial Limusa Wiley. México. 755 p.
- Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM. (2017). Aprueba los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo. Normas Legales. Diario Oficial El Peruano. Sáb. 02 de diciembre 2017. Lima – Perú.
- Desaint S., Arrault S., Siblot S., y Fournier C. (2003). Genetic transfer of the *mcd* gene in soil. *J. Appl. Microbiol.* Vol. 95 (1): 102-8.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, W. (2008). *InfoStat, versión 2008.* Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Diáñez, F. (2005). *Evaluación de la capacidad supresora de la microbiota bacteriana y fúngica del compost de orujo de vid frente a hongos fitopatógenos.* Tesis doctoral. Departamento de producción vegetal. Universidad de Almería. España 276 p.
- Drake, W. (1974). The role of mutation in microbial evolution. Pp. 41-58 in Carlile J. & Skehel J. (editors). *Evolution in the Microbial World.* Cambridge University Press,



- Cambridge.
- Dreisback, H. y Robertson W. (1988). Manual de toxicología clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Edit. El manual moderno. 12° Edición. pag. 95-105.
- Duxbury, M., Smith M. y Doran J. (1989). Organic matter as a source and a sink of plant nutrients. p. 33-68. In: Coleman, D.C., J.M. Oades y G. Uehara (eds.). Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems. University of Hawaii Press. Honolulu, Hawaii.
- Ecured de Cuba. (2020). Ficha de información: Tamaron. <https://www.ecured.cu/Tamaron>
- Eddleston, M., Eyer, P., Mohamed, F., Azhar, S., Sheriff, M., Dawson, A., y Buckley, N. (2005). Diferencias entre los insecticidas organofosforados en el autoenvenenamiento humano. *Lanceta*, 1452-9.
- Erickson, B. y Mondello, F. (1992). Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *Journal of bacteriology*, 174 (9), 2903-2912.
- Escalante, M. (2018). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias *Azotobacter* sp aisladas de suelos cultivados de la región Puno y su efecto en plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) 2108. Tesis de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 80 p.
- Eskenazi, B., Harley, K., Bradman, A., Weltzien, E., Jewell, N., Barr, D., and N. Holland. 2004. Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Environ. Health Persp.* 112(10):1116-1124.
- FAO. (1979). Recommended methods for the detection and measurement of the



- resistance of agriculture pests to pesticides. *FAO plant protection bull*, 39-32.
- Fernández, D., Mancipe, L., y Fernández, D. (2010). Intoxicación por organofosforados. Bogotá. *Rev Fac Med*, 18, 84-92. <http://www.unimilitar.edu.co/documents/63968/75951/Articulo%25208%2520Vo1%252018-1.pdf>
- Fernández, L., Rojas N., Roldán T., Ramírez M., Zegarra H., Uribe R. *et al.* (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 180 p.
- Ferrari, B., Binnerup, S., y Gillings, M. (2005). Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (12), 8714–8720.
- Furukawa, K., y T. Miyazaki T. (1986). Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Journal of bacteriology* 166 (2), 392-398. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=214617&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gisbert, J., y Villanueva, E. (1992). Intoxicaciones por plaguicidas. En G. Calabuig, *Medicina legal y toxicología* (págs. 696-707). Barcelona: Masson-Salvat Medicina.
- GRP, Gobierno Regional Puno. (2014). Estudio de suelos y capacidad de uso mayor (Departamento de Puno). Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente. Región Puno. Perú. 136 p. [http://geoservidorperu.minam.gob.pe/geoservidor/Archivos/Mapa/puno/Memoria\\_Descriptiva\\_Suelos\\_CUM.pdf](http://geoservidorperu.minam.gob.pe/geoservidor/Archivos/Mapa/puno/Memoria_Descriptiva_Suelos_CUM.pdf).
- Hashimoto, M., Fukui M., Hayano K., y Hayatsu, M. (2002). Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hydrolase gene (*cehA*) from *Rhizobium* sp.





- Strain AC100. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 68: 1220-1227.
- Hashimoto, T., Whang, K., y Nagaoka K. (2006). A quantitative evaluation and phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in subsurface upland soil using improved culturability. *Biology Fertility Soils*, 42 (3), 179 – 185.
- Hernández M., Álvarez A. y Ríos A. (2017). Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. *Rev. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 18 (1): 138 – 159.
- Hernández, A., Martínez J. y Castillo D. (2005). Biotransformación de malation por cepas de *Rhizobium* aisladas de *Desmodium tortuosum* (Sw) DC. *Rev. Foresta Veracruzana* 7 (2): 53 – 58.
- Horne, I., Sutherland T., Harcourt R., Russell R. y Oakeshott J. (2002). Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol.* 68 (7): 3371-3376.
- Iwamoto, T., y Nasu, M. (2001). Current bioremediation practice and perspective. *Journal of bioscience and bioengineering* 92 (1), 1-8.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233049>.
- Jadin, P., y Jacquemart, P. (1978). Effet de l'irrigation sur la précocité des jeunes cacaoyers. *Café Cacao*. 22 (1), 31–35.
- Jaramillo, E., Bermúdez A. y Tirado I. (2016). Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados presentes en suelos contaminados. *Rev. Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 25 (3): 13 – 22.
- Kopytko M., Torres C. y Gómez E. (2017). Biodegradación estimulada de los suelos contaminados con pesticidas organoclorados. *Rev. RIAA*. Vol. 8 (1): 119 – 130.
- Kuai, L., Kerstens W, PhuCuong, N. y Verstraete, W. (1999). Treatment of domestic



- wastewater by enhanced primary decantation and subsequent naturally ventilat – ed trickling filtration. *Water, Air, and Soil Pollution*. 113: 43-62.
- Leal, S., Valenzuela A., Gutiérrez M., Bermúdez M., García J., Aldana M., *et al.* (2014). Residuos de plaguicidas organoclorados en suelos agrícolas. *Rev. Terra Latinoamericana*. Vol. 32 (1): 1 – 11.
- Lewis, E., Donarski J., Wild R. y Raushel M. (1988). Mechanism and stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by a bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry*. 27 (5): 1591-1597.
- Luján, D. (2019). Uso de *Pseudomonas aeruginosa* en biorremediación. *Rev. Bio Tecnología*. Vol. 23 (1): 32-42.
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. 10 edición revisada. Madrid: Prentice Hall Iberia. p. 986.
- Madigan, T., Martinko, J., y Parker, J. (2000). *Brock. Biología de los microorganismos*. 8° edición. Prentice Hall. Madrid. 986 p.
- Manco, G., Porzio E. y Suzumoto Y. (2018). Enzymatic detoxification: a sustainable means of degrading toxic organophosphate pesticides and chemical warfare nerve agents. *J Chem Technol Biotech*. 93 (8): 2064–2082.
- Mantilla, G., de Latorre, S., Gómez, C., Ordóñez, N., Ceballos, J., Euscategui, C., *et al.* (2000). El medio ambiente en Colombia. Cap. 6. Los suelos: estabilidad, productividad y degradación. Publicación del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM).
- Marín, F., y Jaramillo B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Revista chilena de nutrición*. 42 (2), 179-185.
- Marín, L. y Jaramillo B. (2015) Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas



- organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Revista Chilena de Nutrición*. (42) 2, junio 2015. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art10.pdf>.
- Maroni, M., A. Fanetti, and F. Metruccio. 2006. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. *Med. Lav.* 97(2):430-7.
- Márquez J. (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una permanente en distintas épocas de muestreo. Tesis de Licenciado en Ciencias Biológicas. Valdivia, Chile.
- Marschner, P. (2011). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, Third Edition*. Academic Press. 672 p.
- Marzorati, M., Balloi A., y Francesca De Ferra, D. (2010). Identification of molecular markers to follow up the bioremediation of sites contaminated with chlorinated compounds. Pp: 16. *En: Streit, W. y R. Daniel (Eds.). Metagenomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science + Business Media.
- Maya K., Upadhyay N., Singh S. y Dubey K. (2012). Degradation kinetics of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (tcp) by fungal communities. *Bioresour Technol*, 126, 216-223.
- Mc Faddin, J. (1991). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. México DF. Editorial Médica Panamericana.
- Melloni, R., Nóbrega, R., Moreira, F., y Siqueira, J. (2004). Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxite, em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28 (1), 85–93.
- Mendía, K. (2020). Biodegradación de malatión residual en suelo de cultivo de papa, con bacterias autóctonas. Tesis de Ingeniera Ambiental en Prevención y Remediación, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Universidad de las Américas.



Ecuador. 103 p.

- Meyer, O. y Schlegel G. (1978). Reisolation of the carbon monoxide utilizing hydrogen bacterium *Pseudomonas carboxidovorans* (Kistner) comb. nov. Arch. Microbiol. 118: 35-43.
- Mireles, M., Villarreal A., Villegas J., Martínez A., Rodríguez G. y Rosas N. (2018). Caracterización de cepas nativas de suelos agrícolas tolerantes a imiclopid. Mexican Journal of Biotechnology. 3 (2): 47-62.
- Montaño, M., Sandoval A., Nava M., Sánchez, J. y García F. (2013). Variación espacial y estacional de grupos funcionales de bacterias cultivables del suelo de un bosque tropical seco en México. Int. J. Trop. Biol, 61 (1), 439-453.
- Montoro, Y., Moreno R., Gomero L. y Reyes M. (2009). Características de uso de plaguicidas químicos y riesgos para la salud en agricultores de la sierra central del Perú. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 26 (4): 466 – 472.
- Niti, C., S. Sunita, K. Kamlesh, and K. Rakesh. 2013. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. Res. J. Chem. Environ. 17(4):88-105.
- Ogata, K., y Zúñiga, D. (2008). Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huánuco. Revista Zonas Áridas, 12 (1), 191 – 208.
- Ormeño, M., y Ovalle, A. (2011). Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la calidad química de los suelos cacaoteros y el crecimiento de las plántulas en vivero. Ed. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, INIA, Mérida. En: Memorias XIX Congreso Venezolano de la Ciencia del Suelo. 6 p.
- Ou, L., Trabue L., y Ogram V. (2001). Dynamics of carbofuran degrading microbial communities in soil during three successive annual applications of carbofuran. Soil Biology and Biochemistry. 33 (1): 75-81.
- Oviedo, L., y Díaz, L. (2017). Microorganismos nativos tolerantes a Atrazina aislados de



- suelos agrícolas en el departamento de Córdoba, Colombia. Rev. Colombiana Cienc. Animal, 9 (supl), 60-66. DOI: 10.24188/recia.v9.nS.2017.522
- Paro, R., Tiboni, G., Buccione, R., Rossi, G., Cellini, V., Canipari, R. and S. Cecconi. 2012. The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 260(2):155-61.
- Pérez, G. (2014a). Cuantificación de la microbiota fúngica y bacteriana en el suelo de un cultivo bajo plástico en Almería. Proyecto Monográfico, Departamento de Agronomía, Universidad de Almería. España. 149 p.
- Pérez, G. (2014b). Evaluación de la capacidad degradadora y acción de biorremediación de bacterias presentes en suelos con residuos de pesticidas de la florícola Penciaflor. Bachelor's thesis, Quito. Universidad de las Américas. 208 p.
- Pernasetti, O. (2010). Cátedra de salinidad y sodicidad de los suelos. Catamarca Argentina: Universidad Nacional de Catamarca. 56 p.
- Quinchía, M., Gómez A., Palencia K. y Giraldo E. (2006). Evaluación de la resistencia de un aislado bacteriano nativo compatible con *Pseudomona* sp. al insecticida Lorsban 4 EC. Revista EIA, (5): 101 – 108.
- Racke, D. (1990). Pesticides in the soil microbial ecosystem. En enhanced biodegradation of pesticides in the environment. Washington D.C.: American Chemistry Society. p. 625.
- Rauh, V., F. Perera, M. Horton, R. Whyatt, R. Bansal, X. Hao, J. Liu, D. Boyd, T. Slotking, and B. Peterson. 2012. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. PNAS 109(20):7871-7876.
- Reyes, I. y Valery A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. Biagro. 19 (3): 117-126.



- Rivera, M., Ferrera R., Volke V., Rodríguez R. y Fernández L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Revista Terra*. 20.
- Rodríguez, D. (2018). Capacidad de remoción de compuestos organofosforados por *Serratia marescens* en suelos contaminados del distrito de Moche. Tesis de Ingeniero Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad César Vallejo, Trujillo – Perú. 67 p.
- Rodríguez, R., y Rodríguez M. (2019). Biorremediación de suelo de la chinampa ubicada en Cuemanco delegación Xochimilco, D. F. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Vol. 17 (1): 48-58.
- Romero, M., Santamaría D., y Zafra, C. (2009). Bioingeniería y suelo: abundancia microbiológica, pH y conductividad eléctrica bajo tres estratos de erosión. *Rev. Umbral Científico*, (15), 67-74.
- Sánchez, J. y Henry C. (2012). Degradación del aldrín por *Bacillus licheniformis*, aislado del agua y sedimento de la ciénaga grande de Santa Marta. *Acta Biológica Colombiana*. 17 (1): 67 – 76.
- Satoh, T. y Hosokawa M. (2000). Organophosphates and their impact on the global environment. *Neurotoxicology*. 21 (1-2): 223-7.
- Scholer, M., Dilly, O., y Munch, J. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, 255–262.
- Shukla, Y. and A. Arora. 2001. Transplacental carcinogenic potential of the carbamate fungicide mancozeb. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*. 20(2):127-131.
- Silambarasan, S, y Abraham, J. (2012). Ecofriendly method for bioremediation of chlorpyrifos from agricultural soil by novel fungus *Aspergillus terreus* jas1. *Water Air Soil Pollut*, 224, 1369.



- Silberman, J. (2016). Diversidad microbiana y materia orgánica del suelo en sistemas silvopastoriles de la Región Chaqueña. Tesis de Doctor en Ciencias Agrarias y Forestales. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires – Argentina. 198 p.
- Singh, S., Hyun Kang S., Mulchandani A. y Chen W. (2008). Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current opinion in biotechnology* 19 (5): 437-444. Resumen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760355>.
- Sivila de Cary, R. y Angulo, W. (2006) Efecto del descanso agrícola sobre la microbiota del suelo (Patarani - Altiplano Central boliviano). *Ecología en Bolivia*. 41 (3): 103-115.
- Sogorb, A., Pla A. y Vilanova, E. (1996). Las esterasas que hidrolizan compuestos organofosforados: un mecanismo eficaz de detoxificación. *Rev Toxicol*. 13: 43-48.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. *Plant physiology*. 4th ed. Sunderland, MA. Sianuer Associates Inc. 1338 p.
- Taylor, J., Wilson, B., Mills, M., y Burns, R. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soil and subsoils using various techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 387- 401.
- Thieman, W., y Palladino M. (2010). Introducción a la Biotecnología. Editorial Pearson Educación, S. A. Madrid – España. 406 p.
- Tirado, P., Jaramillo D. y Bermúdez T. (2014). Obtención de cepas bacterianas con capacidad degradativa de compuestos organofosforados del suelo contaminado de un barrio de Cartagena-Bolívar. Tesis de Master, Universidad de Cartagena. Colombia.



- Tomasek, H., y Karns J. (1989). Cloning of a carbofuran hydrolase gene from *Achromobacter* strain WM111 and its expression in Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. Vol. 171: 4038-4044.
- Trejo, A., N. Rivero y J. Ordonez. 2014. Exposición a plaguicidas en niños de la zona platanera del soconusco, Chiapas. *Revista AIDIS* 7(2):179-188.
- Uribe, D. y Sánchez J. (2010). *Soil Biology and Agriculture in the Tropics*. Berlin (Germany): Springer-Verlag. p. 235-250.
- Valdiviezo, A. (2019). Evaluación de la capacidad de microorganismos edáficos para degradar pesticidas (lorsban 480). Tesis de Ing. Ambiental. Universidad de las Américas. Quito – Ecuador.
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current opinion in biotechnology* 12, 237-241.
- Weselak, M., Arbuckle, T., y Foster, W. (2007). Exposición a pesticidas y resultados de desarrollo: la evidencia epidemiológica. IIM Ottawa, 41-80.
- WHO. (1992). Vector resistance to pesticide. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO tech, 349.263.
- Woignier, T., F. Clostre., P. Cattan, J. Levillain, Y. M. Cabidoche and M. Lesueur-Jannoyer. 2014. Diagnosis and management of field pollution in the case of an organochlorine pesticide, the Chlordecone. In: Hernandez Soriano, Maria C., dir., *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination* (Edit). Rijeka, HRV: InTech. Chapter 21: 615-636.
- Wu, J., Hong, Q., Chen, N., y Li, P. (2006). Analysis of the degrading products of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. with GC/MS and GC/FTIR. *Spectroscopy and Spectral Analysis*. Vol. 26 (5): 1716–1719.
- Wu, P., Zhang Y., Chen Z., Wang Y., Zhu F., Cao B., Wu Y. y Li N. (2018). The





organophosphorus pesticides in soil was degraded by *Rhodobacter sphaeroides* after wastewater treatment. *Biochem Eng J.*

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.019>

Yan, Q., Hong, Q., Han, P., Dong, X., Shen, Y y Li, S. 2007. Isolation and characterization of a carbofuran degrading strain *Novosphingobium* sp. *FEMS Microbiology Letters.* 271(2): 207–213.

Yang, C., Liu N., Guo X. y Qiao C. (2006). Cloning of mpd gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS microbiol let.* 265 (1): 118-125.

Yarzabal, A. (2010). Agricultural development in tropical acidic soils, potential and limits of phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biology and Agriculture in the Tropics.* 21: 209-233.

Zhai, R., Zhang B., Wan Y., Li C., Wang J. y Liu J. (2013). Chitosan–halloysite hybrid-nanotubes: horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. *Chem Eng J.* 214: 304–309.

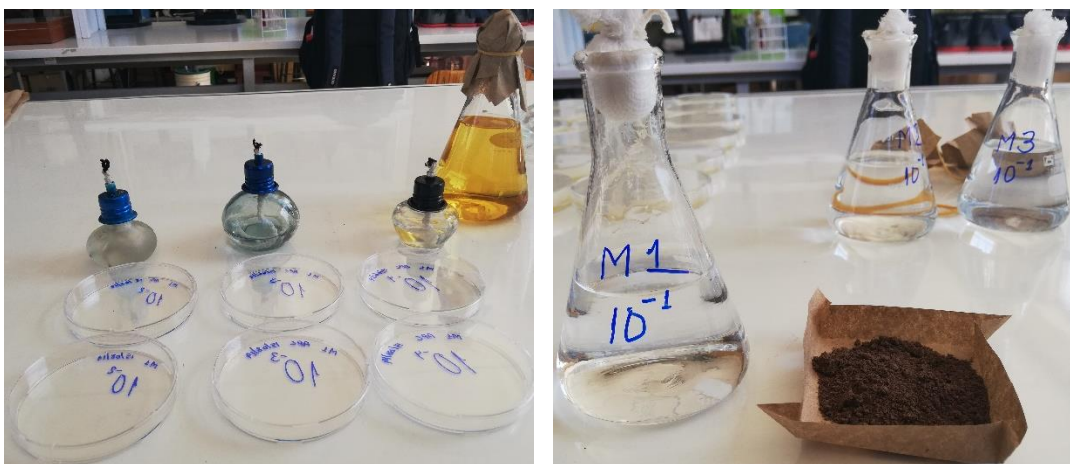
Zhang, W., Sun J., Chen S, Wu Y. y He F. (1992). Levels of exposure and biological monitoring of pyrethroids in Spraymen. *Briths Journal of Industrial Medicine.* 48:2, 82-86.

## ANEXOS

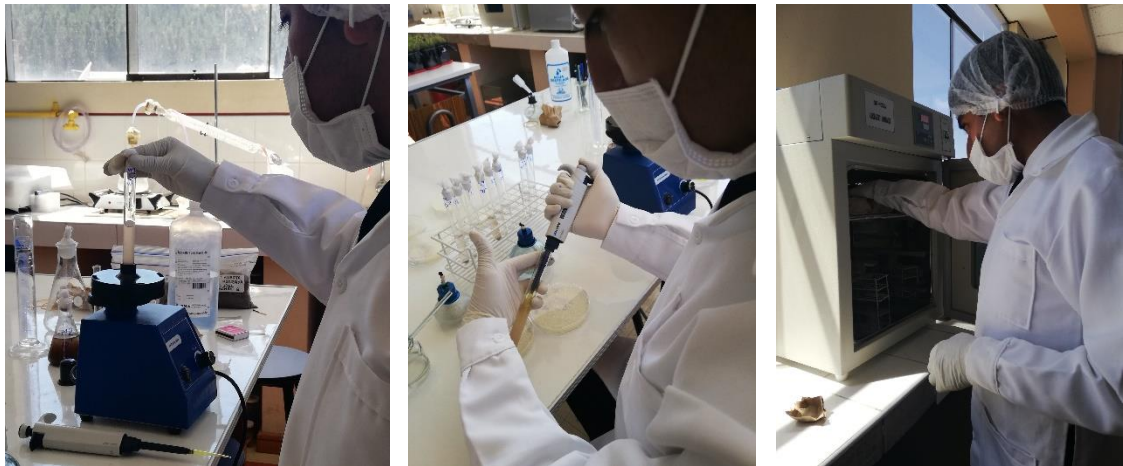
### Anexo 1. Galería de fotos.



**Figura 12.** Muestreo de tierra en tres localidades.



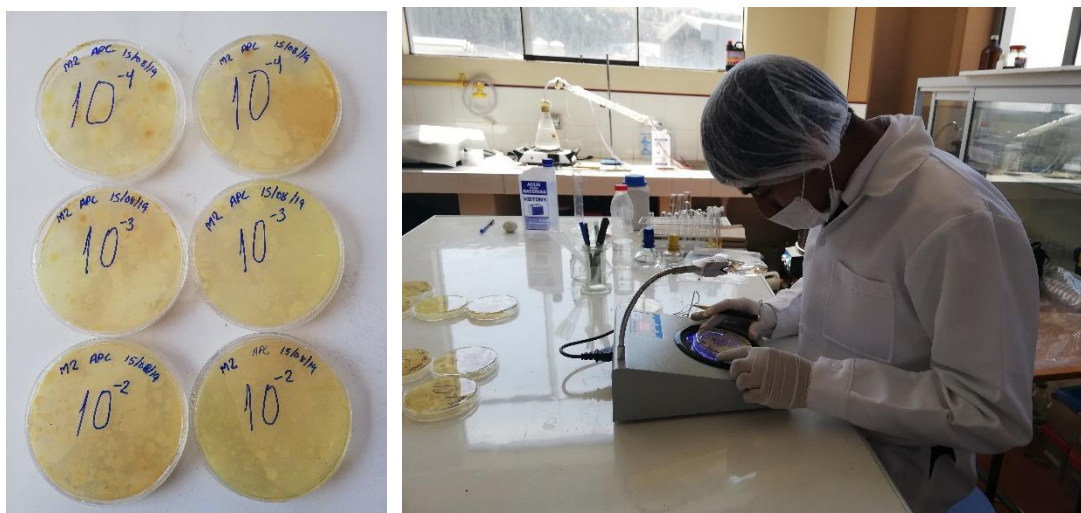
**Figura 13.** Procedimiento para el recuento bacteriano en muestras de tierra en tres localidades.



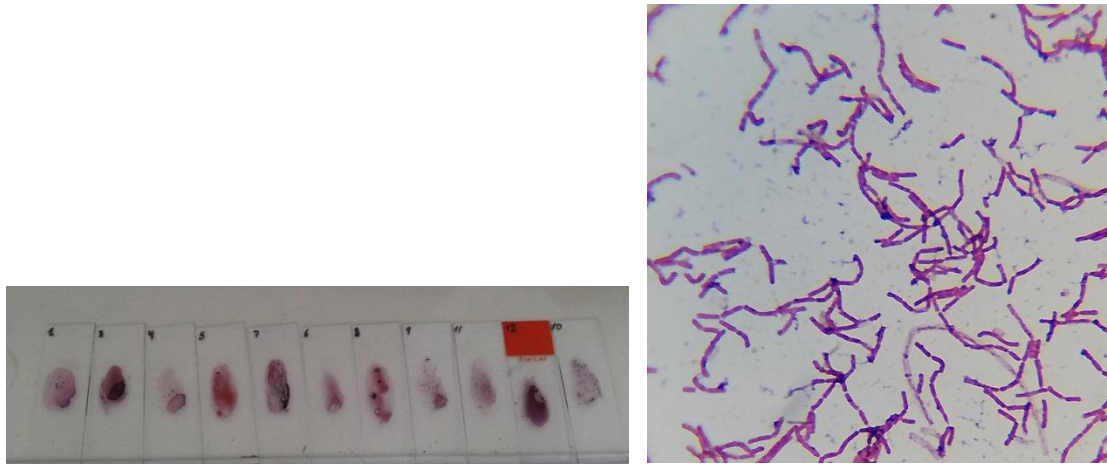
**Figura 14.** Uso de materiales y equipos en el proceso de recuento bacteriano en muestras de tierra en tres localidades.



**Figura 15.** Preparación de diluciones y cultivo en agar APC para el recuento bacteriano en muestras de tierra en tres localidades.



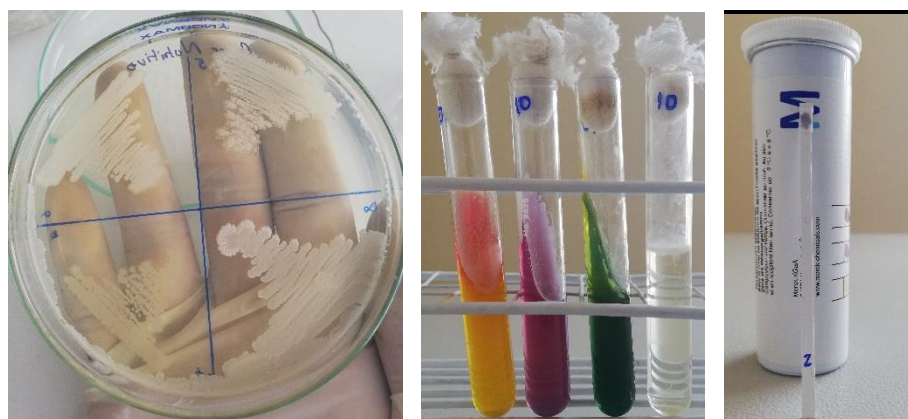
**Figura 16.** Recuentos de colonias bacterianas en muestras de tierra de tres localidades.



**Figura 17.** Coloración Gram y observación de bacterias al microscopio óptico compuesto (1000X).



**Figura 18.** Preparación de medios, esterilización y cultivos bacterianos para identificación bacteriana.



**Figura 19.** Cultivos puros de bacterias aisladas, pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CS e Indol) y prueba de la oxidasa para identificación bacteriana.



**Figura 20.** Preparación de soluciones de insecticidas a diferentes concentraciones.



**Figura 21.** Cultivo de bacterias en agar Plate Count con diferentes concentraciones de insecticidas Matador y Tamaron.



**Figura 22.** Recuento de colonias bacterianas en agar Plate Count a diferentes concentraciones.

| Variable | LOCALIDADES    | N | Medias | D.E.  | Medianas | gl | H     | p      |
|----------|----------------|---|--------|-------|----------|----|-------|--------|
| RCTO     | Huerta Huaraya | 6 | 282.33 | 7.47  | 285.50   | 2  | 11.79 | 0.0027 |
| RCTO     | Ichu           | 6 | 75.00  | 19.94 | 75.50    |    |       |        |
| RCTO     | Jayllihuaya    | 6 | 88.83  | 4.12  | 90.00    |    |       |        |

| Trat.          | Ranks   |
|----------------|---------|
| Ichu           | 5.50 A  |
| Jayllihuaya    | 7.50 A  |
| Huerta Huaraya | 15.50 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Figura 23.** Prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos para comparar los recuentos bacterianos en suelos de tres localidades, agosto a octubre 2019.

| Variable | MESES     | N | Medias | D.E.   | Medianas | gl | H    | p      |
|----------|-----------|---|--------|--------|----------|----|------|--------|
| RCTO     | Agosto    | 6 | 143.67 | 112.40 | 91.50    | 2  | 2.32 | 0.3133 |
| RCTO     | Octubre   | 6 | 144.17 | 99.88  | 84.00    |    |      |        |
| RCTO     | Setiembre | 6 | 158.33 | 99.71  | 97.00    |    |      |        |

**Figura 24.** Prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencia estadística de los recuentos bacterianos según meses de muestreo, agosto a octubre 2019.

| Variable       | Concentración | N | Medias | D.E.  | Medianas | gl | H    | p      |
|----------------|---------------|---|--------|-------|----------|----|------|--------|
| Pseudom UFC C1 |               | 3 | 223.33 | 15.28 | 220.00   | 2  | 7.20 | 0.0036 |
| Pseudom UFC C2 |               | 3 | 100.00 | 10.00 | 100.00   |    |      |        |
| Pseudom UFC C3 |               | 3 | 151.67 | 7.64  | 150.00   |    |      |        |

| Trat. | Ranks    |
|-------|----------|
| C2    | 2.00 A   |
| C3    | 5.00 A B |
| C1    | 8.00 B   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Figura 25.** Prueba de Kruskal Wallis de los recuentos de colonias de *Pseudomonas* frente a tres concentraciones de Matador, agosto a octubre 2019.

| Variable   | Concentración | N | Medias | D.E.  | Medianas | gl | H    | p      |
|------------|---------------|---|--------|-------|----------|----|------|--------|
| Bac UFC C1 |               | 3 | 290.00 | 10.00 | 290.00   | 2  | 3.76 | 0.1679 |
| Bac UFC C2 |               | 3 | 270.00 | 26.46 | 260.00   |    |      |        |
| Bac UFC C3 |               | 3 | 253.33 | 15.28 | 250.00   |    |      |        |

**Figura 26.** Prueba de Kruskal Wallis de los recuentos de colonias de *Bacillus* frente a tres concentraciones de Matador, agosto a octubre 2019.

| Variable    | Concentración | N | Medias | D.E.  | Medianas | gl | H    | p      |
|-------------|---------------|---|--------|-------|----------|----|------|--------|
| Serr UFC C1 |               | 3 | 216.67 | 20.82 | 210.00   | 2  | 5.60 | 0.0464 |
| Serr UFC C2 |               | 3 | 233.33 | 30.55 | 240.00   |    |      |        |
| Serr UFC C3 |               | 3 | 143.33 | 15.28 | 140.00   |    |      |        |

| Trat. | Ranks    |
|-------|----------|
| C3    | 2.00 A   |
| C1    | 6.00 A B |
| C2    | 7.00 B   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Figura 27.** Prueba de Kruskal Wallis de los recuentos de colonias de *Serratia* frente a tres concentraciones de Matador, agosto a octubre 2019.

| Variable   | Concentración | N   | Medias | D.E.  | Medianas | gl | H    | p      |
|--|---------------|-----|--------|-------|----------|----|------|--------|
| Pseudom UFC TAM C1   |               | 3   | 255.00 | 18.03 | 260.00   | 2  | 5.49 | 0.0464 |
| Pseudom UFC TAM C2   |               | 3   | 270.00 | 26.46 | 280.00   |    |      |        |
| Pseudom UFC TAM C3   |               | 3   | 298.33 | 7.64  | 300.00   |    |      |        |
| <b>Trat. Ranks</b>   |               |     |        |       |          |    |      |        |
| C1   | 2.67          | A   |        |       |          |    |      |        |
| C2   | 4.50          | A B |        |       |          |    |      |        |
| C3   | 7.83          | B   |        |       |          |    |      |        |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) |               |     |        |       |          |    |      |        |

**Figura 28.** Prueba de Kruskal Wallis de recuentos de colonias de *Pseudomonas* frente a tres concentraciones de Tamaron, agosto a octubre 2019.

| Variable            | Concentración | N | Medias | D.E.  | Medianas | gl | H    | p      |
|---------------------|---------------|---|--------|-------|----------|----|------|--------|
| Bacillus UFC TAM C1 |               | 3 | 268.33 | 17.56 | 270.00   | 2  | 5.09 | 0.0690 |
| Bacillus UFC TAM C2 |               | 3 | 320.00 | 26.46 | 310.00   |    |      |        |
| Bacillus UFC TAM C3 |               | 3 | 256.67 | 66.58 | 290.00   |    |      |        |

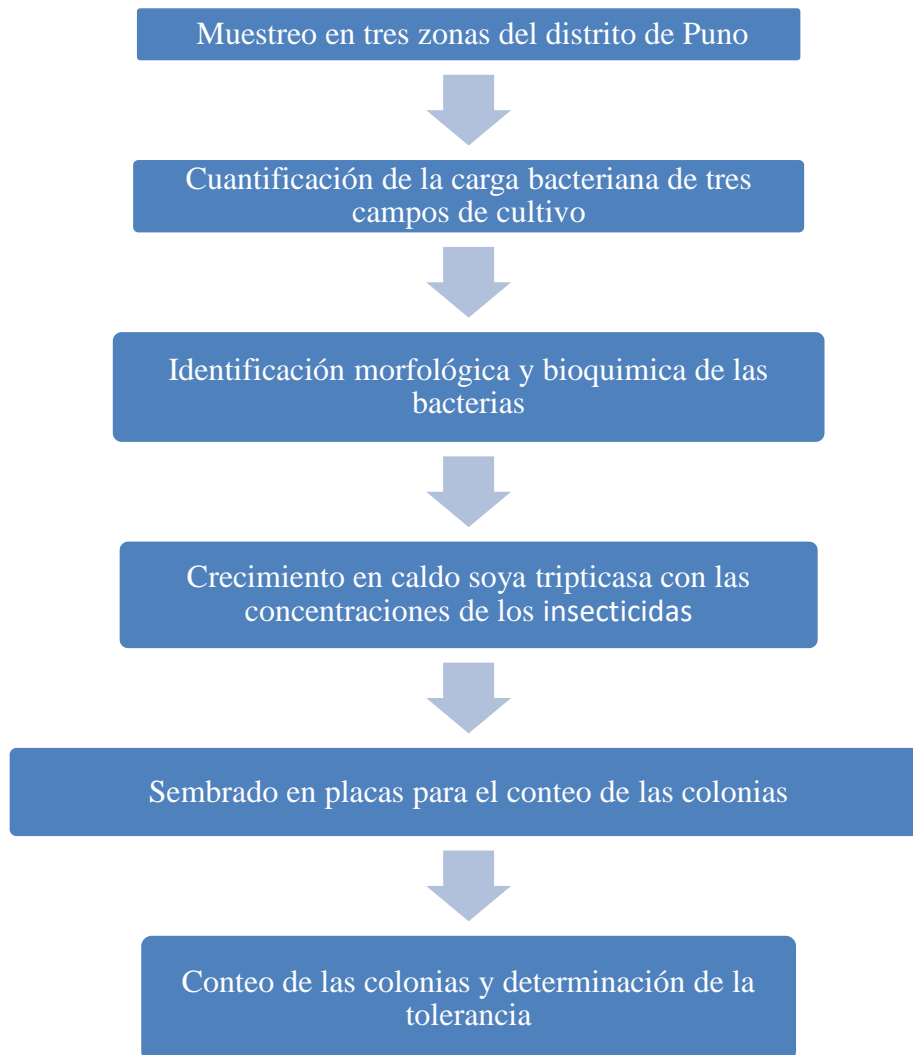
**Figura 29.** Prueba de Kruskal Wallis de recuentos de colonias de *Bacillus* frente a tres concentraciones de Tamaron, agosto a octubre 2019.

| Variable   | Concentración | N   | Medias | D.E.  | Medianas | gl | H    | p      |
|--|---------------|-----|--------|-------|----------|----|------|--------|
| Serratia UFC TAM C1  |               | 3   | 169.67 | 26.65 | 159.00   | 2  | 6.82 | 0.0071 |
| Serratia UFC TAM C2  |               | 3   | 233.33 | 30.55 | 240.00   |    |      |        |
| Serratia UFC TAM C3  |               | 3   | 46.67  | 15.28 | 50.00    |    |      |        |
| <b>Trat. Ranks</b>   |               |     |        |       |          |    |      |        |
| C3   | 2.00          | A   |        |       |          |    |      |        |
| C1   | 5.17          | A B |        |       |          |    |      |        |
| C2   | 7.83          | B   |        |       |          |    |      |        |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) |               |     |        |       |          |    |      |        |

**Figura 30.** Prueba de Kruskal Wallis de recuentos de colonias de *Serratia* frente a tres concentraciones de Tamaron, agosto a octubre 2019.



**Figura 31.** Fotografías de los insecticidas adquiridos en una tienda agropecuaria de la ciudad de Juliaca, para los experimentos de la investigación.



**Figura 32.** Diagrama de flujo de la investigación realizada para la tesis.





*Universidad Nacional del Altiplano de Puno*

Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Profesional de Biología  
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico  
Laboratorio de Botánica y Biotecnología



**Registro: 007-2020**

## **CONSTANCIA**

LA QUE SUSCRIBE, **DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO – PERÚ.**

### **HACE CONSTAR:**

Que el (la) Bachiller **JOEL CRHISTIAN MAMANI QUENALLATA**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado la parte experimental de su trabajo de investigación (Tesis) titulado: **TOLERANCIA *IN VITRO* A DOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS DE BACTERIAS AISLADAS DE TRES CAMPOS DE CULTIVO DEL DISTRITO DE PUNO**, en el laboratorio de Botánica y Biotecnología, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de agosto a noviembre del 2019.

Se le expide la presente Constancia a solicitud del (a) interesado (a) para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 03 de noviembre del 2020.



**UNA**  
PUNO

Firmado digitalmente por LAURA  
CHAUCA DE MEZA Eva FAU  
20145498170 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 03.11.2020 15:31:35 -05:00

**M. Sc. EVA LAURA CHAUCA**  
**DECANO**  
**FCCBB – UNA Puno**