



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

**“EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA AL PESTICIDA  
GLIFOSATO DE LA MICROBIOTA AISLADA DE LA LAGUNA  
DE COLTA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Presentado para optar por el grado académico de:  
**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTORAS: CATHERINE PAOLA MACAS RAMIREZ**

**KATHERINE JOHANA TIPANTASIG CHICAIZA**

**DIRECTOR: Ph.D. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ**

**Riobamba – Ecuador**

**2019**

© 2019, Catherine Paola Macas Ramírez y Katherine Johana Tipantasig Chicaiza.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Nosotras, Catherine Paola Macas Ramírez y Katherine Johana Tipantasig Chicaiza, declaramos que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciado.

Como autoras, asumimos la responsabilidad legal y académicas de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a las Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Riobamba, 24 de junio del 2019

Catherine Paola Macas Ramírez

060561876-8

Katherine Johana Tipantasig Chicaiza

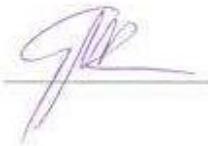
060459803-7

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal de trabajo de titulación experimental certifica que: El trabajo de Titulación: Tipo proyecto de Investigación "EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA AL PESTICIDA GLIFOSATO DE LA MICROBIOTA AISLADA DE LA LAGUNA DE COLTA", de responsabilidad de las señoritas Catherine Paola Macas Ramírez y Katherine Johana Tipantasig Chicaiza, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
PhD. Fausto Manolo Yaulema Garcés <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2019-06-24
PhD. Gerardo Emilio Medina Ramírez <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		2019-06-24
PhD. Verónica Lucia Caballero Serrano <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>		2019-06-24

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme permitido cumplir una meta más en mi vida y darme su infinito amor, a mis padres por el esfuerzo y buenos valores que me han inculcado, la capacidad para afrontar a la vida y luchar hasta cumplir con mis metas, por brindarme el apoyo y la confianza para culminar con este arduo trabajo, y a mi esposo por el apoyo incondicional y paciencia en cada etapa de este trabajo.

A nuestro tutor Dr. Gerardo Medina por su apoyo, comprensión y confianza en la realización de este trabajo.

Catherine Paola Macas Ramírez

El presente trabajo de titulación quiero dedicar a Dios por darme la sabiduría y sobre toda la salud para llegar a cumplir mis propósitos y en especial a mis padres Jorge y Nancy por su esfuerzo, sacrificio y lucha constante para llegar a culminar esta etapa de mi vida académica. Por brindarme su apoyo incondicional en cada etapa de mi carrera y no dejarme decaer cuando las cosas se complicaban. Por tenerme paciencia y apoyarme en los buenos y malos momentos y nunca dejarme sola. Por sus consejos que me han ayudado a crecer personalmente, y a mis hermanas Paola, Mishell y a mi tía Amparo por el apoyo incondicional y los ánimos que me han brindado hasta el momento.

Katherine Johana Tipantasig Chicaiza

## **AGRADECIMIENTO**

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias químicas por brindarme su apoyo hasta convertirnos en profesionales éticos, morales con conocimientos necesarios para desarrollar un buen desempeño laboral.

Un agradecimiento especial al PhD. Gerardo Medina director del trabajo de investigación por el apoyo incondicional, paciencia, ayuda, conocimiento, tiempo y dedicación que ha empleado a este trabajo de investigación.

A la Dra. Yolanda Buenaño por todas las facilidades brindadas en la realización de la parte práctica de este trabajo, por sus conocimientos brindados y por su calidad como persona y docente.

Un agradecimiento especial a la comunidad del Cantón Colta Parroquia Santiago de Quito por su colaboración en la realización de las encuestas y de este trabajo.

Catherine Paola Macas Ramírez

Katherine Johana Tipantasig Chicaiza

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	xv
<b>SUMMARY</b> .....	xvi
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
 <b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEORICO REFERENCIAL</b> .....	4
<b>1.1. Antecedentes</b> .....	4
<b>1.2. Marco conceptual</b> .....	5
<i>1.2.1. Contaminación ambiental</i> .....	5
<i>1.2.2. Contaminación del agua</i> .....	5
<i>1.2.3. Efecto de agroquímicos sobre el agua</i> .....	6
<i>1.2.4. Transporte de los agroquímicos en el agua</i> .....	6
<i>1.2.5. Contaminación por residuos industriales</i> .....	7
<i>1.2.6. Microbiota del Agua</i> .....	7
<i>1.2.6.1. Microorganismos autóctonos</i> .....	8
<i>1.2.6.2. Microorganismos alóctonos</i> .....	8
<i>1.2.6.2.2. Microorganismos patógenos del agua y sus efectos en la salud</i> .....	8
<i>1.6.2.1. Microorganismos extremófilos</i> .....	10
<i>1.6.2.2. Microorganismos psicrófilos</i> .....	10
<i>1.6.2.3. Microorganismos psicrotolerantes</i> .....	11
<b>1.2.7. Cultivo de microorganismos</b> .....	11
<i>1.2.7.1. Clasificación de los medios de cultivo</i> .....	11
<i>1.2.7.2. Crecimiento microbiano</i> .....	12
<b>1.2.8. Glifosato</b> .....	12
<i>1.2.8.1. Disponibilidad del glifosato en el suelo</i> .....	13

1.2.8.2.	<i>Inactivación del glifosato</i> .....	13
1.2.8.3.	<i>Efectos del glifosato en la biodiversidad</i> .....	14
1.2.8.4.	<i>Efectos del glifosato en la salud</i> .....	14
1.2.9.	<i>Lagunas de alta montaña</i> .....	15
1.2.10.	<i>Cantón Colta</i> .....	15
1.2.11.	<i>Laguna de Colta</i> .....	15

## CAPÍTULO II

2.	<b>MARCO METODOLOGICO</b> .....	18
2.1.	<i>Tipo de la investigación</i> .....	18
2.2.	<i>Diseño de la investigación</i> .....	18
2.2.1.	<i>Unidad de análisis</i> .....	18
2.2.2.	<i>Población de estudio</i> .....	18
2.3.	<i>Materiales, equipos y reactivos</i> .....	18
2.3.1.	<i>Material biológico</i> .....	18
2.3.2.	<i>Material de laboratorio</i> .....	19
2.3.3.	<i>Equipos</i> .....	19
2.3.4.	<i>Reactivos</i> .....	19
2.4.	<i>Métodos y técnicas</i> .....	20
2.4.1.	<i>Fase de determinación del pesticida</i> .....	20
2.4.2.	<i>Tamaño de la muestra</i> .....	20
2.5.	<i>Técnicas de recolección de datos</i> .....	21
2.6.	<i>Determinación del pH</i> .....	22
2.7.	<i>Determinación de la temperatura</i> .....	22
2.8.	<i>Análisis de laboratorio</i> .....	22
2.8.1.	<i>Preparación de los medios de cultivo</i> .....	22
2.8.2.	<i>Siembra de las muestras de agua</i> .....	23
2.8.3.	<i>Aislamiento de los clones bacterianos</i> .....	23

2.8.4.	<i>Aislamiento por agotamiento</i> .....	24
2.8.5.	<i>Descripción de la morfología macroscópica de las colonias bacterianas</i> .....	24
2.8.6.	<i>Tinción de GRAM de los aislados bacterianos puros</i> .....	25
2.8.7.	<i>Descripción de la morfología microscópica de las colonias microbianas</i> .....	26
2.8.8.	<i>Evaluación de la tolerancia de los clones aislados al glifosato</i> .....	26
2.8.9.	<i>Evaluación de la tolerancia de las bacterias al Paraquat</i> .....	26
2.8.10.	<i>Evaluación de la resistencia a antibióticos</i> .....	26

### **CAPÍTULO III**

<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.</b>	<b>Aplicación de la encuesta</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.</b>	<b>Recuento de los microorganismos presentes en la laguna de Colta</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3.</b>	<b>Aislamiento y estabilización de los clones bacterianos</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.</b>	<b>Aislamiento por agotamiento e identificación morfológica</b> .....	<b>44</b>
<b>3.4.1.</b>	<i>Caracterización morfológica macroscópica de los clones aislados</i> .....	<b>44</b>
<b>3.5.</b>	<b>Microorganismos Tolerantes</b> .....	<b>57</b>
<b>3.5.1.</b>	<i>Tolerancia a glifosato de los clones aislados</i> .....	<b>57</b>
<b>3.5.2.</b>	<i>Tolerancia a Paraquat de los clones aislados y estabilizados</i> .....	<b>63</b>
<b>3.6.</b>	<b>Resistencia a antibióticos</b> .....	<b>65</b>

<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>69</b>
---------------------------	-----------

<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>70</b>
------------------------------	-----------

### **BIBLIOGRAFICA**

### **ANEXOS**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>PCA</b>	Agar
<b>PCA.AL</b>	Agar con agua de la laguna
<b>KOW</b>	n-octanol/ agua
<b>S10</b>	Streptomycin
<b>OX1</b>	Oxacillin
<b>NN</b>	Neomicina
<b>ME5</b>	Methicillin
<b>K30</b>	Kanamycin
<b>CZ30</b>	Cefazolin
<b>CAZ30</b>	Ceftazidime
<b>mL</b>	Mililitro
<b>μL</b>	Microlitro

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1</b>	Ejemplos de microorganismos patógenos presentes en agua .....	9
<b>Tabla 2-2</b>	Preparación de medios de cultivo.....	233
<b>Tabla 3-3</b>	Estimación del crecimiento bacteriano de las Muestras (A-F) inoculadas sobre medio PCA e incubada a Temperatura ambiente y 35°C. ....	30
<b>Tabla 4-3</b>	Estimación del crecimiento bacteriano de la Muestra (A-F) inoculada sobre medio PCA. AL e incubada a Temperatura ambiente y 35°C.....	31
<b>Tabla 5-3</b>	Estimación del crecimiento bacteriano de la Muestra (A-F) inoculada sobre medio PCA suplementado con glifosato a Temperatura ambiente y 35°C .....	32
<b>Tabla 6-3</b>	Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA a Temperatura ambiente.....	33
<b>Tabla 7-3</b>	Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA a 35°C .....	34
<b>Tabla 8-3</b>	Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA.AL a Temperatura ambiente.....	36
<b>Tabla 9-3</b>	Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA.AL a 35°C.....	37
<b>Tabla 10-3</b>	Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA suplementado con glifosato a Temperatura ambiente .....	39
<b>Tabla 11-3</b>	Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA suplementado con glifosato a 35°C .....	40
<b>Tabla 12-3</b>	Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA a temperatura Ambiente .....	42
<b>Tabla 13-3</b>	Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA 35°C.....	43
<b>Tabla 14-3</b>	Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA.AL a temperatura ambiente .....	45
<b>Tabla 15-3</b>	Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA.AL a temperatura 35°C.....	47
<b>Tabla 16-3</b>	Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente.....	48
<b>Tabla 17-3</b>	Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA suplementado con glifosato a 35°C.....	49

<b>Tabla 18-3</b>	Resultado de la Tinción Gram de los clones aislados a partir de medio PCA a temperatura ambiente y 35°C.....	51
<b>Tabla 19-3</b>	Resultado de la Tinción Gram de los clones aislados a partir de medio PCA.AL a temperatura ambiente y a 35°C .....	52
<b>Tabla 20-3</b>	Resultado de la Tinción Gram de los clones aislados a partir de medio PCA suplementada con glifosato a temperatura ambiente y 35°C.....	53
<b>Tabla 21-3</b>	Resultado del crecimiento de los clones aislados en PCA a temperatura ambiente y 35°C en medio PCA suplementado con glifosato a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4,5 mL/100mL) .....	55
<b>Tabla 22-3</b>	Resultado del crecimiento de los clones aislados en PCA.AL a temperatura ambiente y 35°C en medio PCA suplementado con glifosato a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4,5 mL/100mL) .....	57
<b>Tabla 23-3</b>	Resultado del crecimiento de los clones aislados en PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente y 35°C en medio PCA suplementado con glifosato a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4,5 mL/100mL) .....	59
<b>Tabla 24-3</b>	Resultado del crecimiento de los clones mas tolerantes a glifosato aislados a temperatura ambiente y 35°C en presencia de paraquat en tres concentraciones (1, 2, 3mL/100mL) luego de 72 horas de cultivo en medio PCA, PCA.AL,PCA suplementado con glifosato .....	61
<b>Tabla 25-3</b>	Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina S10, Oxacillin OX1, Neomicina NN sobre los clones aislados del PCA a temperatura ambiente y a 35°C.....	64
<b>Tabla 26-3</b>	Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina (S10), Oxacillin (OX1), Methicillin (ME5), Ceftazidime (CAZ30) sobre los clones aislados del PCA.AL tolerante (4mL/100mL) de glifosato y a (3mL/100mL) de paraquat temperatura ambiente. ....	64
<b>Tabla 27-3</b>	Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina S10, Oxacillin OX1, Neomicina NN, Methicillin ME5, Kanamycin K30, Ceftazidime CAZ30 sobre los clones aislados del PCA suplementados con glifosato y paraquat temperatura ambiente. ....	65
<b>Tabla 28-3</b>	Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina S10, Oxacillin OX1, Neomicina NN, Methicillin ME5, Cefazolin CZ30, Ceftazidime CAZ30 sobre los clones aislados del PCA suplementado glifosato y paraquat temperatura 35°C.....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b>	Estructura química del Glifosato.....	12
<b>Figura 2-1</b>	Mapa de ubicación de la Laguna de Colta .....	166
<b>Figura 1-2</b>	Puntos de muestreo en la laguna de Colta .....	21
<b>Figura 2-2</b>	Muestreo del punto 1 y 10.....	22
<b>Figura 3-2</b>	Descripción de la morfología de las colonias bacterianas.....	24
<b>Figura 4-2</b>	Tinción Gram .....	25
<b>Figura 5-2</b>	Descripción de la morfología microscópica de las colonias microbianas .....	26

## ÍNDICE DE GRAFICOS

<b>Gráfico 1-3.</b>	Tipos de Pesticidas utilizados en los cultivos que se encuentran alrededor de la laguna de Colta.....	28
<b>Gráfico 2-3.</b>	Pesticidas utilizados en los cultivos que se encuentran alrededor de la laguna de Colta .....	29
<b>Gráfico 3-3.</b>	Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA a temperatura ambiente. ....	58
<b>Gráfico 4-3.</b>	Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA a 35°C. ....	58
<b>Gráfico 5-3.</b>	Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA.AL a temperatura ambiente. ....	60
<b>Gráfico 6-3.</b>	Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA.AL a 35°C. ....	60
<b>Gráfico 7-3.</b>	Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente. ....	61
<b>Gráfico 8-3.</b>	Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA suplementado con glifosato a 35°C.....	62

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> Encuesta.....	80
<b>ANEXO B</b> Tipos de Pesticidas determinados en la encuesta.....	81
<b>ANEXO C</b> Puntos de muestreo para el estudio microbiológico .....	82
<b>ANEXO D</b> Medición in situ de los parámetros físico-químicos de la laguna .....	82
<b>ANEXO E</b> Siembra de las muestras del agua de la Laguna en las cajas Petri con PCA, PCA.AL, PCA suplementado con glifosato.....	83
<b>ANEXO F</b> Resultados del recuento bacteriano en cada sitio muestreado trascurrido 24 horas .	83
<b>ANEXO G</b> Algunas colonias bacterianas que se seleccionaron para los repiques.....	84
<b>ANEXO H</b> Repiques de las colonias bacterianas .....	85
<b>ANEXO I</b> Siembra de los clones bacterianos por agotamiento de estrías.....	86
<b>ANEXO J</b> Tinción Gram de los clones bacterianos puros .....	86
<b>ANEXO K</b> Pruebas de tolerancia al Glifosato .....	87
<b>ANEXO L</b> Pruebas de tolerancia al Paraquat.....	89
<b>ANEXO M</b> Antibiograma de los clones bacterianos.....	91

D. Chuquinaga  
24-01-19

## RESUMEN

La actividad agrícola influye en el deterioro de la calidad del agua debido a la incorporación de plaguicidas utilizados para la protección de cultivos. El propósito de esta investigación fue evaluar la tolerancia al Glifosato de microorganismos aislados de muestras de agua de la Laguna de Colta.; tomando 12 muestras de 10mL alrededor de la laguna, sembrándolas en medio de cultivo PCA agua destilada, medio Agar PCA agua de la laguna, PCA con glifosato, se incubaron a temperatura ambiente y 35°C durante 24 horas o hasta observar crecimiento. Se procedió al aislamiento de los microorganismos basándose en una característica representativa. Se realizó tres replicas, el ultima repica se sembró por agotamiento. Se realizó tinción de Gram mostrando a temperatura ambiente Gram positivos (63%) y Gram negativas (33%), y a 35°C Gram positivas (47%) y Gram negativas (56%) en el medio Agar PCA agua destilada, mientras que el medio PCA agua de la laguna las dos temperaturas presentaron 50% Gram positivas y 50% Gram negativas, en cambio en medio PCA con glifosato se determinó a temperatura ambiente 58% Gram positivas y 42% Gram negativas y a 35°C 64% Gram positivas y 36% Gram negativas. Para determinar la tolerancia los clones se cultivaron en medio PCA con glifosato a concentraciones (1; 2; 3; 4; 5 mL/100 mL) obteniendo trece clones en concentración 5mL/1000mL, y pruebas de tolerancia al Paraquat en tres concentraciones (1; 2; 3mL/100 mL) obteniendo nueve clones en concentración 3mL/1000mL. Se realizó la evaluación de resistencia a antibióticos obteniendo mayor sensibilidad al Oxacillin. Durante este estudio se concluyó que las bacterias aisladas presentan más tolerancia al glifosato, permitiendo que se adapten a ambientes contaminados con glifosato, la tolerancia presentada por las bacterias podrá ser utilizada para la biorremediación, sin embargo, se recomienda realizar una mayor evaluación para obtener resultados más exactos.

**Palabras clave:** <BIOTECNOLOGÍA> <MICROBIOLOGÍA> <GLIFOSATO>  
<MICROORGANISMOS> <CRECIMIENTO MICROBIANO> <TOLERANCIA AL  
GLIFOSATO> <TOLERANCIA AL PARAQUAT> <LAGUNA DE COLTA>



## THESIS ABSTRACT

The agricultural activity influences in the water quality deterioration due to the pesticides incorporation used for the crops protection. The purpose of this researching was to evaluate the glyphosate tolerance of isolated microorganisms of water samples from the Colta Lagoon; taking 12 samples of 10 mL around the lagoon, PCA with glyphosate, those were incubated at room temperature and 35° C during 24 hours or until growing was observed. The microorganism's isolation was carried out based on a representative characteristic. Three replicas were realized; the last replica was seeded for exhaustion. The Gram staining was carried out, showing positive Gram (63%) at room temperature and negative Gram (33%), and at 35°C positive Gram (47%) and negative Gram (56%) in the Agar PCA medium distilled water; while in the PCA medium, lagoon water, the two temperatures showed 50% positive Gram and 50% negative Gram; however, in the PCA medium with glyphosate the 58% of positive Gram were determined at room temperature and 42% of negative Gram, and at 35°C 64% of positive Gram and 36% of negative Gram. To determine the tolerance, the clones were cultivated in the PCA medium with glyphosate to concentrations (1; 2; 3; 4; 5 mL/100 mL), obtaining thirteen clones in 5 mL/1000 mL concentration, and tolerance tests to the Paraquat in three concentrations (1; 2; 3 mL/100 mL), obtaining nine clones in 3 mL/1000 mL concentration. The antibiotic resistance evaluation was carried out, obtaining higher sensibility to the Oxacillin. During this study it was concluded that isolated bacteria show more tolerance to the glyphosate, allowing them to adapt they to contaminated environments with glyphosate, the tolerance presented by the bacteria be used for the bioremediation, however, it is recommended to realize a greater evaluation to obtain more exact results.

**Key words:** <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <GLYPHOSATE>, <MICROORGANISMS>, <MICROBIAL GROWTH>, <GLYPHOSATE TOLERANCE>, <PARAQUAT TOLERANCE>, <COLTA LAGOON>



## INTRODUCCION

Las aguas pueden ser divididas tanto superficiales como subterráneas, las mismas que son utilizadas en la agricultura, ganadería y sobre todo para el aseo y consumo humano. (Proaño, 2011, p. 1,2)

Existen diferentes tipos de aguas en el mundo las cuales no han sido analizadas por diferentes factores ya que algunas de ellas se encuentran en lugares que no son de fácil acceso o su población microbiana es muy heterogénea. (Veintimilla, 2015,p.2)

El incremento de la población provoca un crecimiento en las ciudades generando la necesidad de bienes mediante las actividades industriales, provocando una mayor cantidad de residuos que constituyen un peligroso problema de contaminación de lagos, lagunas y ríos, por la producción de grandes cantidades de aguas servidas. Otra fuente de contaminación son las precipitaciones las cuales arrastran consigo sobrantes de pesticidas y fertilizantes utilizados por la actividad agrícola.(Emagen, 2015,p.1)

La laguna de Colta es un cuerpo de agua ubicado en el Cantón Colta, tiene una extensión de 2149 hectáreas de las cuales 204 hectáreas corresponden a la laguna, tradicionalmente ha sido utilizada como fuente de agua para las actividades humanas y actualmente además es utilizada para la recreación. (Gobierno Municipal de Colta - COLTA, 2009,p.1)

Las acciones de los humanos y animales que residen en los alrededores de la laguna afectan las características de ella por ejemplo su microbiota. Una de estas acciones es la actividad agrícola la cual incorpora a la laguna, una gran variedad y cantidad de sustancias (agroquímicos) y organismos (por ejemplo, bacterias patógenas), provocando efectos negativos sobre la calidad del agua y sobre la población de sus alrededores.(Serrano, 2014,p.3)

El glifosato es un herbicida utilizado por los agricultores para erradicar plantas no deseadas y cultivos ilícitos en el área rural. Es un herbicida de amplio espectro, desarrollado para la eliminación de hierbas y de arbustos, en especial los perennes. Es absorbido por las hojas, se puede aplicar a las hojas, inyectarse a troncos y tallos o pulverizarse a tocones como herbicida forestal. Existen actualmente en el mercado especies de plantas de maíz, algodón que son resistentes al glifosato. El uso del herbicida es objeto de controversia desde el punto de vista toxicológico y ambiental debido a que altera la microbiota existente y produce afectaciones a los animales y al ser humano. (Cortina et al., 2017,p.2)

Durante 2001, se comercializaron 127 millones de litros de pesticidas, de los cuales los herbicidas constituyeron entre el 61 y 66 por ciento. Es evidente, que estas sustancias se han constituido como protagonistas de la agricultura, dentro de estas sustancias una de la más importante es el glifosato. (Suárez, Zaccagnini and Brodeur, 2013, p.4,5)

En la Laguna de Colta existe una temperatura promedio de 12 a 16 °C, razón por la cual en esta laguna podríamos encontrar microorganismos psicrófilos. También pueden existir microorganismos por la presencia de sustancias químicas producidas de diferentes actividades que realizan las personas de sus alrededores, estos microorganismos producen enzimas activas a bajas temperaturas que degradan algunas sustancias, es de esperar que entre la microbiota se hayan generado bacterias capaces de degradar estas sustancias contaminantes. (Guamán, 2015)

Por lo anteriormente expuesto se pretende en el marco de este proyecto de investigación, realizar un análisis microbiológico para conocer la presencia en la Laguna de Colta de bacterias tolerantes al glifosato, teniendo en cuenta que de los microorganismos autóctonos algunos podrían adaptarse a la presencia de los contaminantes pudiendo convertirse en herramientas Biotecnológicas para la biorremediación.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias, dentro del grupo de investigación en Microbiología Ambiental dentro de la línea de Ingeniería de Procesos y Protección Ambiental en la sublínea de Biotecnología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Evaluar la tolerancia al pesticida Glifosato de microorganismos aislados a partir de muestras de agua de la Laguna de Colta.

### **Específicos**

- Realizar una encuesta entre los agricultores de los alrededores de la laguna de Colta para determinar cuáles son los pesticidas más utilizados.
- Cultivar muestras de agua de la Laguna en medios de cultivo suplementados y sin el pesticida Glifosato y aislar algunos de los clones obtenidos.
- Determinar la tolerancia al Glifosato de las bacterias aisladas.

# CAPITULO I

## 1. MARCO TEORICO REFERENCIAL

### 1.1. Antecedentes

En el mundo existen lagunas de alta montaña que se formaron en los últimos 25000 años como resultado de la desaparición de los glaciares. En los últimos años se ha incrementado la investigación sobre microorganismos presentes en ambientes extremos como bacterias y hongos que forman parte de la microbiota de estas lagunas, debido a que presentan características especiales, o las propiedades de sus enzimas posiblemente tienen un gran potencial como recursos de aplicación biotecnológica por ejemplo en la extracción de ADN, aditivos alimenticios, o la producción de detergentes. (Flores and Ríos, 1998, p. 1,2) (Garzón, 2013,p.5)

Hace unos años atrás se creía que la vida existía en ambientes limitados y en condiciones normales de temperatura, pH, salinidad y presión. Un factor importante es la temperatura porque afecta directamente al crecimiento y supervivencia de los microorganismos. Existen temperaturas extremas con rangos de 0°C a 100 °C encontrándose bajo crecimiento de microorganismos, sin embargo, existen rangos óptimos de crecimiento que varían entre diferentes grupos de microorganismos. (Garzón, 2013,p.1)

Las lagunas son importantes para las culturas indígenas porque son usadas como recurso hídrico, también son consideradas como un lugar sagrado, ahí se realizaban ritos para adorar a los dioses.(Flores and Ríos, 1998, p. 1,2)

En los últimos años los hombres han utilizado los pesticidas para el control de malezas y plagas en los cultivos los cuales han llegado a los cuerpos de agua, sin embargo, desde hace muchos años se ha constituido un problema ambiental que causan los fertilizantes de base nitrogenada y fosfatada aplicados a gran escala durante periodos prolongados, sobre el suelo y agua, modificando los ciclos climáticos y las propiedades naturales del agua, por ejemplo el exceso de residuos orgánicos en las aguas superficiales aledañas a campos de cultivo. (Worms, 2017, p. 1)

El uso del pesticida glifosato sirve por ejemplo para eliminar las plantas de las cuales se obtiene la droga disminuyendo la producción, tráfico y consumo de drogas y se estima que más de 200 millones de personas en el mundo consumen alucinógenos.(Cortina *et al.*, 2017,p.3,4)

Un estudio realizado por Orta sobre Contaminación de las aguas por pesticidas indicó que los pesticidas son utilizados para combatir plagas, enfermedades y malezas en cultivos agrícolas, los cuales no están exentos de inconvenientes. En los últimos años existe un gran deterioro de la calidad del agua afectando a las diferentes formas de vida acuática. (Orta Arrazcaeta, 2002,p,5,6)

## **1.2. Marco conceptual**

### ***1.2.1. Contaminación ambiental***

El ambiente es un conjunto de elementos naturales o antropogénicos donde el ser humano desarrolla sus actividades. Siendo este su entorno, el cual se encuentra amenazado por la contaminación. (Obela, 2012, p. 1,3)

La contaminación ambiental es la introducción de cualquier sustancia nociva o energía ya sea de origen biológico, químico o físico producido por la intervención de los seres humanos, que explotan los recursos naturales modificando las condiciones naturales. (Serkonten, 2017, p. 1,3)

### ***1.2.2. Contaminación del agua***

El agua es una molécula formada por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno unidos por enlaces covalentes. Es un recurso renovable natural indispensable para la vida, utilizada en la agricultura para el riego de los cultivos. Es un líquido incoloro, inodoro e insípido. Se lo encuentra en 3 estados sólido, líquido y gaseoso. Más del 70% de la superficie del planeta está cubierta por agua de los cuales el 97,5% se encuentra en los océanos y mares, el 2,5% es agua dulce. Del total de agua dulce el 69% se encuentra en los polos y cumbres de las altas montañas, el 30% se encuentra en la humedad del suelo y los acuíferos profundos y el 1% escurre por las cuencas hidrográficas hasta llegar a los lagos, lagunas, acuíferos y otros cuerpos superficiales de agua que se encuentran disponibles para consumo humano. (Agua.org.mx, 2010; Ministerio del Ambiente Peru, 2016,p.1)

Del 1% que se encuentra disponible para el consumo humano el 69% es utilizado por el sector agropecuario, el 19% por el sector industrial y el 12% por el sector municipal. (Agua.org.mx, 2011,p.1)

El agua es usada dentro y fuera de nuestro cuerpo, por ejemplo, dentro de nuestro cuerpo cumple con diferentes funciones entre otras ayuda a regular la temperatura corporal, transporta nutrientes y elimina toxinas, también sirve como el medio acuoso para realizar las reacciones metabólicas del cuerpo, fuera de nuestro cuerpo el agua también es utilizada por ejemplo para el aseo personal,

para el riego en los cultivos, lavar los alimentos, limpieza. (González, 2012, p. 1,2)

La contaminación del agua es la alteración de la calidad del agua que puede ser expresada como un cambio químico, físico o biológico generado por la introducción de materia o energía de forma directa o indirecta provocando un efecto dañino para todas las formas de vida existentes. Al beber esta agua puede producir graves problemas de salud. (Ortega, 2015, p. 1,13)

### ***1.2.3. Efecto de agroquímicos sobre el agua***

Según la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura un pesticida es una sustancia que ayuda a prevenir y/o controlar las plagas para obtener mejores rendimientos en el crecimiento de los cultivos, de esta forma el uso de agroquímicos aumenta día a día. (Peluso, 2013, p. 1)

La actividad agrícola produce un efecto negativo sobre la calidad de las aguas. Los campos de cultivos generalmente están asociados a llanuras costeras y altas montañas cruzados por ríos a los cuales llegan los residuos de los pesticidas utilizados para la protección de cultivos. Los pesticidas llegan a los cuerpos de agua por diferentes vías, ya sea por la superficie o en el interior del suelo, los cuales son arrastrados por el agua y el viento. (Orta Arrazcaeta, 2002, p. 3)

Las aguas que fluyen sobre la superficie de la tierra por ejemplo las lluvias que corren hacia las zonas bajas disuelven los pesticidas presentes en el suelo, la distribución ocurre por difusión. La solubilidad del pesticida en el agua es muy importante, ya este influye en la acumulación en la cadena trófica. Utilizando el coeficiente de partición n-octanol/agua (KOW) y el factor de bioconcentración se puede prever la evolución de un pesticida en el medio acuático, mediante esto podemos conocer la contaminación, el medio de transporte para saber dónde está presente el pesticida y poder así diseñar estrategias para eliminar los pesticidas contaminantes del agua. (Orta Arrazcaeta, 2002, p. 4)

Además, no sólo el agua superficial puede ser contaminada por el uso de agroquímicos ya que ellos pueden ingresar a aguas subterráneas por lixiviación pudiendo alcanzar el agua de pozo utilizada para el consumo humano. (Suárez, Zaccagnini and Brodeur, 2013, p. 1,44)

### ***1.2.4. Transporte de los agroquímicos en el agua***

Los agroquímicos en el agua pueden alcanzar diferentes distancias dependiendo de varios factores tales como el estado físico del producto, estabilidad y velocidad del flujo de agua. Los agroquímicos en el agua pueden estar en solución o suspensión. (Suárez, Zaccagnini and Brodeur, 2013, p.8)

Si los agroquímicos caen en aguas loticas como ríos y arroyos son transportados rápidamente, lo cual no sucede en cuerpos de agua lenticas ya que el agroquímico se queda acumulado debido a que estas aguas se encuentran en reposo, es decir la mayor distancia alcanzada dependerá de algunos factores como por ejemplo si están en solución y si el agua fluye a mayor velocidad. (Suárez, Zaccagnini and Brodeur, 2013,p.2,3)

#### ***1.2.5. Contaminación por residuos industriales***

Las descargas derivadas de las actividades industriales son una de las fuentes más importantes de contaminación, ya que el agua entra en contacto con sustancias químicas como pesticidas, detergentes, metales. Estas aguas son utilizadas por los agricultores para la irrigación, afectando la calidad de los alimentos. (Ecología y medio ambiente en general, 2012, p. 1,3)

Las actividades industriales como la explotación minera, forestal y la agricultura arrojan al ambiente residuos industriales líquidos (RILES) tales como metales pesados (zinc, plomo, cadmio, cromo, mercurio, cobre) y productos químicos tóxicos al suelo o directamente a los cursos de agua. También algunos compuestos orgánicos sintéticos producidos en procesos industriales (producción de papel, químicos, minería, petroquímicos, metalurgia, industria alimentaria) los cuales van a parar a los ríos y al mar.(Ecología y medio ambiente en general, 2012,p.1)

La contaminación industrial produce afectaciones en el ambiente como por ejemplo la alteración del ecosistema que se produce al realizar procesos industriales y esto desechos (metales pesados,etc) entren en contacto con el agua sin ningún tratamiento. (Ecología y medio ambiente en general, 2012,p.2)

#### ***1.2.6. Microbiota del Agua***

En el mar, lagunas, ríos y otros cuerpos de agua existen millones de microorganismos que habitan en ellos de forma natural. Algunos de estos microorganismos como las bacterias, virus, protozoarios pueden llegar a ser perjudiciales para la salud del hombre. (Semarnat, 2007, p. 1)

En las aguas superficiales existen bacterias procedentes del aire, las cuales viven un tiempo limitado en el agua. La población bacteriana existente en cuerpos de agua va a estar relacionada con factores como: composición química, pH, iluminación y temperatura. Existe una gran diferencia entre las bacterias de agua dulce y aquellas presentes en ambientes de agua salada. (Serrano, 2014.p.1)

En los lagos, el contenido y dinámica bacteriana es determinado por el tipo de nutriente que exista en él, las aguas superficiales tienen una población microbiana más variada y rica que las subterráneas, variando estacionalmente y en función de su ubicación geográfica. (Serrano, 2014,p.2)

#### *1.2.6.1. Microorganismos autóctonos*

Los microorganismos propios de cada tipo de agua se conocen como autóctonos, dependen de las propiedades fisicoquímicas del agua entre otros como temperatura, pH, sales minerales y nutrientes, mostrando un mejor crecimiento en medios pobres en carbono, durante tiempos de incubación prolongados. (Ocaña, 2015,p.2,3)

#### *1.2.6.2. Microorganismos alóctonos*

Los microorganismos alóctonos proceden de otros hábitats, están considerados como contaminantes y pueden proceder del suelo, heces o vegetación, estos coexisten con los microorganismos autóctonos adaptándose a las condiciones del este tipo de agua. Dentro de ellos los de mayor interés sanitario son: *Coliformes*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella*. (Ocaña, 2015,p.3)

La presencia en el agua de *Escherichia coli* representa un grave riesgo sanitario, al igual que la *Pseudomona aeruginosa* ya que ambas son bacterias patógenas que pueden producir infecciones y su presencia puede indicar una escasa protección del acuífero. (Ocaña, 2015,p.3)

#### *1.2.6.2.2. Microorganismos patógenos del agua y sus efectos en la salud*

El aumento de bacterias, parásitos, virus y hongos en el agua ya sea por efecto directo o indirecto de cambios en el medio ambiente y en la población tales como urbanización no controlada, crecimiento industrial, pobreza, ocupación de regiones antes deshabitadas, y la disposición inadecuada de excretas humanas y animales favorecen con la contaminación de las aguas, las cuales llegan afectar la calidad microbiológica de las fuentes hídricas produciendo enfermedades a la población aledaña. (Ríos Tobón *et al.*, 2017,p.1,2)

Los microorganismos patógenos normalmente llegan al agua en heces y restos orgánicos producidos por el hombre. Entre los microorganismos patógenos se encuentran las bacterias patógenas oportunistas que se pueden formar parte de las bacterias heterótrofas en los sistemas acuáticos. En la tabla 1.1 se muestran algunos de los microorganismos frecuentemente encontrados en el agua. (Andrade and Orbe, 2010,p.2,3)

**Tabla 1-1** Ejemplos de microorganismos patógenos presentes en agua

<b>Bacterias</b>	<b>Virus</b>	<b>Protozoos</b>
<i>Escherichia</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Entamoeba</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Hepatitis A</i>	<i>Acanthamoeba</i>
<i>Shigella</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>Giardia</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Coxsackie A y B</i>	<i>Schistosoma</i>
<i>Leptospira</i>	<i>Reovirus</i>	
<i>Mycobacterium</i>	<i>Parvovirus</i>	
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Cedecea</i>		
<i>Ralstonia</i>		

Fuente: Félix Andueza, 2014

Las condiciones bacteriológicas del agua son muy importantes, según las normas de calidad, el agua debe estar libre de patógenos de origen entérico y parasitario, ya que estos son los responsables de la transmisión de enfermedades. (Ocaña, 2015, p. 25)

Los controles rutinarios de los microorganismos que se encuentran en él agua y son riesgosos para la salud, son difíciles de realizar teniendo en cuenta que existe una gran variedad de bacterias patógenas cultivables, porque su aislamiento es complejo. (Ocaña, 2015, p. 26)

Los microorganismos que son utilizados para determinar la calidad del agua son conocidos como microorganismos indicadores de contaminación los cuales deben ser fáciles de aislar y crecer en el laboratorio, su presencia está relacionada con la de otros microorganismos más difíciles de aislar un ejemplo de estos es *Escherichia coli*. (Ocaña, 2015, p. 30)

*Escherichia coli*: Es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Es un bacilo Gram negativo, no exigente, oxidasa negativo, catalasa positiva, anaerobio facultativo, cuya temperatura de crecimiento preferentemente es 37 °C. Son conocidas como agentes responsables de gastroenteritis infantil. (Ocaña, 2015, p. 39)

*Vibrio*: Son bacilos Gram negativos no entéricos, de vida libre y rápido crecimiento. No producen esporas, se mueven de forma errática gracias a un único flagelo, son aerobios y anaerobios facultativos. Algunos de ellos producen diarrea acuosa brusca, grave, con rápida e intensa deshidratación. (García *et al.*, 2010, p.23)

*Salmonella*: Se encuentran en el tracto intestinal asociada a las enfermedades diarreicas, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son móviles debido a la presencia de flagelos. Poseen un metabolismo fermentativo y oxidativo. Necesita un pH entre 6,6 y 8,2. (Parra, Durango and Mattar, 2000, p.4)

*Pseudomonas aeruginosa*: Es un patógeno oportunista que no necesita requerimientos nutricionales exigentes y puede sobrevivir durante mucho tiempo en medio acuoso a temperatura ambiente. Esta bacteria puede proceder de las heces humanas y animales, pudiendo ser causante de infecciones de oído, ojos y piel, por lo que su control en aguas usadas para recreación es obligatorio. (Ocaña, 2015, p. 47)

*Cedecea*: Este género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se trata de bacilos Gram negativos, no fermentadores de lactosa, oxidasa negativos, catalasa positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, sin motilidad y reductores de nitratos, son lipasas positivas. Son bacterias patógenas no frecuentes, oportunistas y con significado clínico no muy determinado, se encuentran en las vías respiratorias superiores, en infecciones de tejidos blandos como úlceras, abscesos y heridas, además en infecciones oftálmicas y bacterianas. (Ocaña, 2015, p. 41)

#### 1.6.2.1. *Microorganismos extremófilos*

Los organismos extremófilos son aquellos que necesitan condiciones extremas para sobrevivir como: temperatura (0- 120°C), pH, alta presión, salinidad, radiaciones. Estos microorganismos forman parte de los dominios Archaea y Bacteria, formando parte de los microorganismos extremófilos podemos encontrar microorganismos eucariotas. (Moreno, 2017, p. 23)

Los microorganismos de los ambientes extremos se adaptan a las condiciones del entorno dependiendo de la función que cada microorganismo desempeñe, la diversidad microbiana en estos ambientes no es reducida. (Moreno, 2017, p.20)

#### 1.6.2.2. *Microorganismos psicrófilos*

Los microorganismos psicrófilos poseen un rango de temperatura óptima entre 0°C y 20°C. Se encuentran en ambientes altamente fríos, como en las regiones polares y sedimentos marinos. (Moreno, 2017, p.22)

Las bacterias psicrófilas la mayoría de ellas proviene de la Antártida, como por ejemplo el género *Flavobacterium*. Mientras que las bacterias que pertenecen de los hábitats polares pertenecen a las especies *Achromobacter*, *Micrococcus* y *Pseudomonas*. (Garzón, 2013, p. 6)

Las bacterias psicrófilas más frecuentes en aguas profundas o en zonas polares son Gram-negativas, entre ellos el más común es el Phylum Bacteroidetes con los géneros: *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes*. (Villalta, 2013, p. 6)

### *1.6.2.3. Microorganismos psicrotolerantes*

Los microorganismos psicrotolerantes, presentan temperaturas óptimas de crecimiento entre 20-40°C, pero también crecen a temperaturas bajas hasta 0°C. Estos microorganismos están más distribuidos en la naturaleza y pueden ser aislados de climas templados también juegan un papel importante en el catabolismo e hidrólisis de los polisacáridos. (Moreno, 2017,p.24)

### *1.2.7. Cultivo de microorganismos*

El medio de cultivo es una combinación entre compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en agua que le suministran las condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano .(Berrios and Berthouly, 1987,p.2) como temperatura, oxígeno, pH, luz, concentración de sales. Por otra parte, también es necesario suministrar necesidades nutricionales como fuente de energía, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, azufre-fosforo, cationes, vitaminas y agua. .(Brooks et al., 1954, p.1)

Los medios de cultivos establecen un aporte de nutrientes indispensables para el crecimiento de los microorganismos. En el caso ambiental es muy importante la selección del medio de cultivo de acuerdo al microorganismo que se desee cultivar. (Sánchez *et al.*, 2015,p.5)

#### *1.2.7.1. Clasificación de los medios de cultivo*

Los medios de cultivos pueden ser clasificados según López and Torres, 2006 considerando características como: (Universidad de Granada España, 2018,p.12)

Consistencia:

- Líquidos (sin agregado se agar),
- Sólidos (contienen del 1 al 2 % de agar)
- Semisólidos (contienen del 0,3 al 0,7 % de agar).

Composición química:

- Sintéticos: Son los medios que comprenden una composición química determinada cualitativamente y cuantitativamente, se emplean para conseguir resultados reproducibles.
- Semisintéticos: Son a los que se les añaden factores de crecimiento en forma de extracto orgánico complejo.

Utilidad:

- **Nutritivos:** Son medios simples que abarcan los nutrientes principales para consentir el crecimiento de una gran variedad de bacterias heterótrofas.
- **Enriquecidos:** El suplemento de componentes orgánicos provenientes de animales o plantas como sangre, suero, vitaminas, aminoácidos u otros al agar, favoreciendo al crecimiento solo de un determinado tipo de microorganismo sin inhibir el crecimiento total de los demás microorganismos.
- **Selectivos:** Son aquellos que favorecen al crecimiento de un determinado microorganismo, inhibiendo el desarrollo de los demás
- **Medios diferenciales:** Adicionando ciertas sustancias químicas a los medios de cultivo se tiene como resultado cierto tipo de crecimiento bacteriano, permitiendo diferenciar distintos tipos de bacterias.

#### 1.2.7.2. Crecimiento microbiano

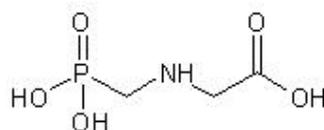
Crecimiento microbiano es el incremento del número de células por unidad de tiempo, el cual va aumentando en cantidad y tamaño progresivamente y este crecimiento va depender de las factores ambientales (temperatura, pH, luz ) y tiempo.(Tortora, Funke and Case, 2006,p.159)

#### 1.2.8. Glifosato

La molécula de “glifosato” fue patentado como principio activo en el herbicida Roundup® a inicios de los años 70 por Monsanto. (Civeira, 2012,p.2)

Como producto que elimina la maleza en el cultivos, establece una de las soluciones agroquímicas más relevantes de este siglo, siendo un herbicida de común uso en el campo agrícola por ser práctico y de fácil aplicación.(Ministerio de Justicia y del Derecho, 2000,p.1)

El glifosato (Figura 1-1) cuyo nombre químico (N-fosfonometilglicina) es un aminofosfonato análogo del aminoácido natural glicina. El nombre se debe al uso de la partícula derivada de glicina y el fosfo-y-ato referido a la presencia del grupo fosfato.(Civeira, 2012,p.2)



**Figura 1-1** Estructura química del Glifosato

**Fuente:** Civeira Gabriela, 2012

Glifosato es un pesticida no selectivo de acción sistémica, no actúa sobre las semillas que se encuentran por debajo del suelo de amplio espectro y utilizado para el control de gran variedad de especies de malezas. Es de hacerse notar que esta sustancia química no posee una acción prolongada y que no afecta al suelo. (Ministerio de Justicia y del Derecho, 2000,p.2)

Glifosato es un herbicida de acción sistemática, no recomendado para el control de malezas por la vía del sistema radicular, es un líquido, claro, viscoso y de color ambarino; normalmente consta de concentraciones de iones H de 4,4 a 4,9 y una gravedad específica de 1,17, con un pequeño olor a amina; tiene un peso molecular de 169,08 y un punto de fusión de 200°C. (Ministerio de Justicia y del Derecho, 2000,p.2). Es un herbicida con alta solubilidad en el agua (10.500ppm, medido a pH 7) (Kogan and Alister, 2005,p.2)

El glifosato llega al suelo de manera directa o indirecta y su disposición final dependerá de su potencial de adsorción (disponibilidad) y de su persistencia en el suelo (degradación, lixiviación entre otros) (Kogan and Alister, 2005,p.5-6), estudios realizados sobre la persistencia de glifosato muestran que este puede estar de 60 días a 1 año en el suelo o en el agua, después de una aplicación directa(Civeira, 2012,p.3). Este puede tener una imperceptible movilidad en el suelo cuando concuerdan condiciones de pH alto y presencia de elevadas concentraciones de fosfatos no orgánicos.(Ministerio de Justicia y del Derecho, 2000,p.7)

#### *1.2.8.1. Disponibilidad del glifosato en el suelo*

El glifosato está disponible en el suelo debido a la acción de los microorganismos presentes en él y al ser absorbido por las raíces de las plantas tanto de cultivo como maleza.

La adsorción de glifosato regula la disponibilidad de este en el suelo, y la escasa o nula actividad que presenta el glifosato en el mismo. Este fenómeno es rápido y ocurre particularmente a través de la porción fosfórica del glifosato, que combate por sitios de adsorción con el fosforo inorgánico debido a que quita al glifosato de los sitios de adsorción. La adsorción del glifosato no está relacionada con la capacidad de intercambio del suelo, pero si con los cationes que se hallan en las arcillas. (Kogan and Alister, 2005,p.4)

#### *1.2.8.2. Inactivación del glifosato*

La inactivación de las propiedades herbicidas se da por la degradación de la molécula liberando dióxido de carbono (Guerrero, 2013,p.9) , puede ser realizada por diversas vías entre las que podemos citar: física, química y biológica.

Física en esta el glifosato omite su capacidad para realizar su efecto biológico al ser adsorbido por arcilla, formando enlaces coordinados.

Química en la cual se emplean materiales básicos como la soda cáustica, es un proceso de inactivación aceptable en procesos exclusivos, como efecto de la reacción se libera energía a manera de calor.

Biológica en la cual la inactivación se realiza por descomposición enzimática de la molécula de glifosato por microorganismos. (Ministerio de Justicia y del Derecho, 2000,p.9)

El glifosato simplemente no es metabolizado por lo vegetales. Al instante que el glifosato entra en contacto con el follaje se mueve en el sistema vascular, llegando a las raíces enseguida. Normalmente los síntomas iniciales visibles en el follaje ocurren al cabo de cuatro a cinco días.

#### *1.2.8.3. Efectos del glifosato en la biodiversidad*

Una gran variedad de animales acuáticos desde algas microscópicas, peces y moluscos son afectados por la exposición al glifosato. Un ejemplo de esto son los rotíferos en los cuales el glifosato reduce la expectativa de vida y tasas de reproducción. Un estudio reciente encontró efectos genotóxicos en los glóbulos rojos de la sangre de las anguilas europeas cuando fueron expuestas al glifosato por un corto período. También existe la sospecha de que el glifosato puede afectar el sistema nervioso de los animales acuáticos de un modo similar a un pesticida organofosforado. (Riley Pete, Cotter Janet, Contiero Marco, 2011,p.5)

#### *1.2.8.4. Efectos del glifosato en la salud*

Según la organización Mundial de la Salud el glifosato produce alteraciones sobre el ADN y cromosomas de células humanas por lo que es considerado carcinógeno en humanos y animales de laboratorio. (International Agency for Research on Cancer, 2014,p.1). También afecta en la producción de hormonas reproductivas tales como la progesterona y el estrógeno. Existe evidencia de que el glifosato también puede afectar el sistema nervioso tanto en humanos como en animales. (Riley Pete, Cotter Janet, Contiero Marco, 2011,p.4)

### **1.2.9. *Lagunas de alta montaña***

Las lagunas representan ambientes particulares en su mayoría pequeñas, son refugios naturales y depósitos biológicos, están ubicadas normalmente en depresiones y son sistemas que en su mayoría no presentan ningún tipo de contaminación (Fuentes-Pérez *et al.*, 2015,p.2)

Las lagunas de alta montaña se encuentran localizadas por encima de los 3.000 m.s.n.m, en estos ambientes una de las características más relevantes que define la vegetación es la temperatura media de 8°C, con una fluctuación que depende de la altura, en donde las temperaturas máximas pueden llegar hasta los 20°C, las precipitaciones dependen de la vertiente y de la altura, y pueden variar entre los 800 y 2000 mm al año, siendo la mayoría de los aguaceros de baja intensidad, pero de una duración considerable, la humedad relativa es de 80% (Gutiérrez, 2015,p.4), normalmente están en lugares escasos en vegetación y con poca disponibilidad de nutrientes.(Pulido-Villena *et al.*, 2003,p.3)

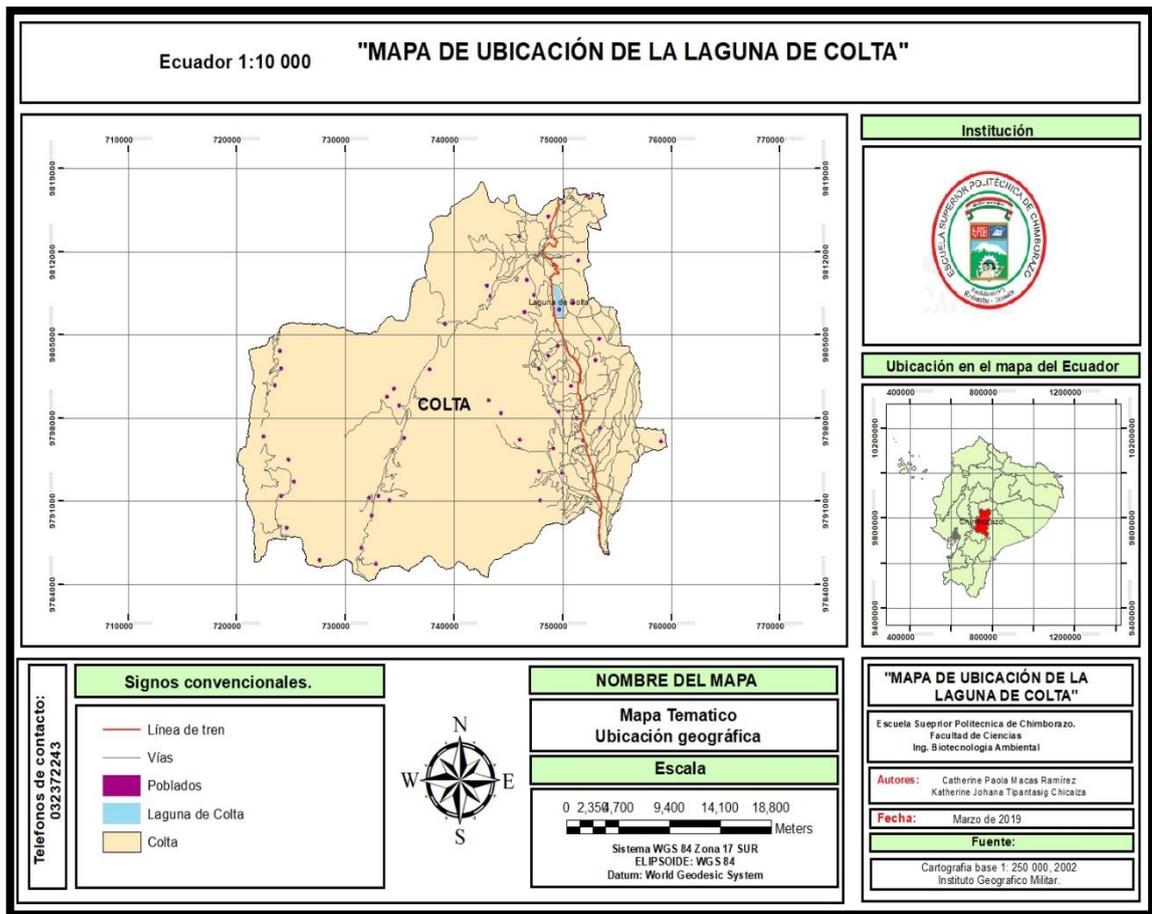
### **1.2.10. *Cantón Colta***

El Cantón Colta se encuentra ubicado en la parte Noroccidental de la Provincia de Chimborazo, a 18 Km de la ciudad de Riobamba y a 206 Km de la ciudad de Quito.(Gobierno Municipal de Colta - COLTA, 2009,p.1)

Se encuentra ubicado a los pies del cerro Cushca, y al Norte del valle de la Antigua Liribamba, constituida por las cuencas que constituyen los ríos Cicalpa y Cajabamba con una altitud de 2750 a 3280 msnm, extensión 850 Km<sup>2</sup>, temperatura entre 6 a 20 °C, latitud 1°39´ a 1° 54´sur, longitud 78° 36´a 78° 59´occidente, humedad relativa del 73%, precipitación 1000 – 1500 mm / año.(Gobierno Municipal de Colta - COLTA, 2009,p.1)

### **1.2.11. *Laguna de Colta***

La laguna de Colta se encuentra localizada en la provincia de Chimborazo, Cantón Colta, Parroquia Santiago de Quito, (Gobierno Municipal de Colta - COLTA, 2009,p.1)



**Figura 2-1** Mapa de ubicación de la Laguna de Colta

Realizado por: Macas, Paola; Tipantasig Katherine, 2019

En la lengua Puruhá la laguna de Colta es conocida como “Curta Kucha”, que significa “Laguna de Pato”, por cuyas orillas pasa el ferrocarril trasandino, de la cabecera cantonal Cajabamba (Villa La Unión), a una altitud de 3.300 msnm, con una temperatura promedio de 12 a 15°; tiene 2800 m. de largo por 1000 m. de ancho, está rodeada en su mayoría de montañas, donde se encuentran una gran variedad de comunidades indígenas. (Gobierno Municipal de Colta - COLTA, 2009, pp 1)

Alrededor de la laguna existe una diversidad en flora sobresaliendo la totora que es utilizada para alimento de animales domésticos como las vacas, así como para fabricar los tradicionales botes de totora que son utilizados en la misma laguna; en la fauna se puede observar peces de colores y los más destacados patos de patas largas, únicos en su especie y que son propios de este lugar. (Gobierno Municipal de Colta - COLTA, 2009, p.1)

La laguna está rodeada por una gran cantidad de terrenos sometidos a una actividad agricultura intensiva, lo cual puede afectar a la laguna mediante la incorporar sustancias químicas debido a la utilización de agroquímicos, lo cual puede afectar directamente la fauna y flora que habita en el cuerpo de agua. (Quintinilla *et al.*, 2017).

Otra forma de contaminación proviene de los animales que están alrededor de la laguna debido a la actividad de pastoreo de cerdos, vacas, ovejas y burros los cuales pueden incorporar materia orgánica, heces fecales y microbiota que pueden ser eventualmente dañina. (Cifuentes, 2017,p.175)

## CAPITULO II

### 2. MARCO METODOLOGICO

#### 2.1. *Tipo de la investigación*

Esta investigación se clasifica como experimental-exploratoria, debido a que es un estudio para descifrar conceptos para resolver un problema del que se posee poca información.

#### 2.2. *Diseño de la investigación*

Esta investigación es Experimental porque se plantea un diseño completamente al azar para determinar el efecto del pesticida glifosato sobre la microbiota aislada de las muestras del agua de la laguna.

##### 2.2.1. *Unidad de análisis*

Bacterias presentes en muestras de agua obtenidas a partir de la laguna de Colta.

##### 2.2.2. *Población de estudio*

El presente trabajo de investigación tomará como objeto de estudio la microbiota presente en muestras de agua de la Laguna de Colta.

**Objeto:** Bacterias

**Sujeto:** Laguna de Colta

#### 2.3. *Materiales, equipos y reactivos*

##### 2.3.1. *Material biológico*

Microorganismos aislados de la laguna de Colta

### 2.3.2. *Material de laboratorio*

- Matraz 500 ml
- Frascos de orina estériles
- Cajas Petri
- Tubos de vidrio tapa roja
- Pipeta graduada 10 ml
- Termómetro
- Asa de platino
- Vaso de precipitación 600ml
- Probeta de 50 ml
- Mechero de alcohol
- Porta objetos
- Mascarilla
- Guantes
- Hisopos
- Puntas amarillas y azules
- Micropipetas
- Papel aluminio
- Probeta
- Piceta

### 2.3.3. *Equipos*

- Autoclave
- Vortex
- Cabina de flujo laminar
- Estufa
- Microscopio
- Balanza digital

### 2.3.4. *Reactivos*

- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Cristal violeta

- Lugol
- Safranina
- Arrasador (Glifosato)
- King (Paraquat)
- PCA Agar Plate Count

## 2.4. Métodos y técnicas

### 2.4.1. Fase de determinación del pesticida

Para obtener información sobre el uso de pesticidas en los alrededores de la laguna de Colta se procedió a realizar encuestas a los agricultores. Para determinar el tipo de pesticida, pesticidas utilizados y la frecuencia de uso. La encuesta está formulada por 8 preguntas (Anexo A) y la población seleccionada fue de 50 personas moradores de sectores aledaños a la laguna. La fórmula utilizada para conocer la población N es finita.

$$n = \frac{Za * p * q * N}{(e^2 * (N - 1)) + Za^2 * p * q}$$

$$n = \frac{1.96^2 * 0.10 * 0.84 * 6225}{(0.08^2 * (6225 - 1)) + 1.96^2 * 0.10 * 0.84}$$

$$n = 50$$

#### En donde

**N** = Total de la población

**Za** = nivel de confianza

**p**= probabilidad de ocurrencia

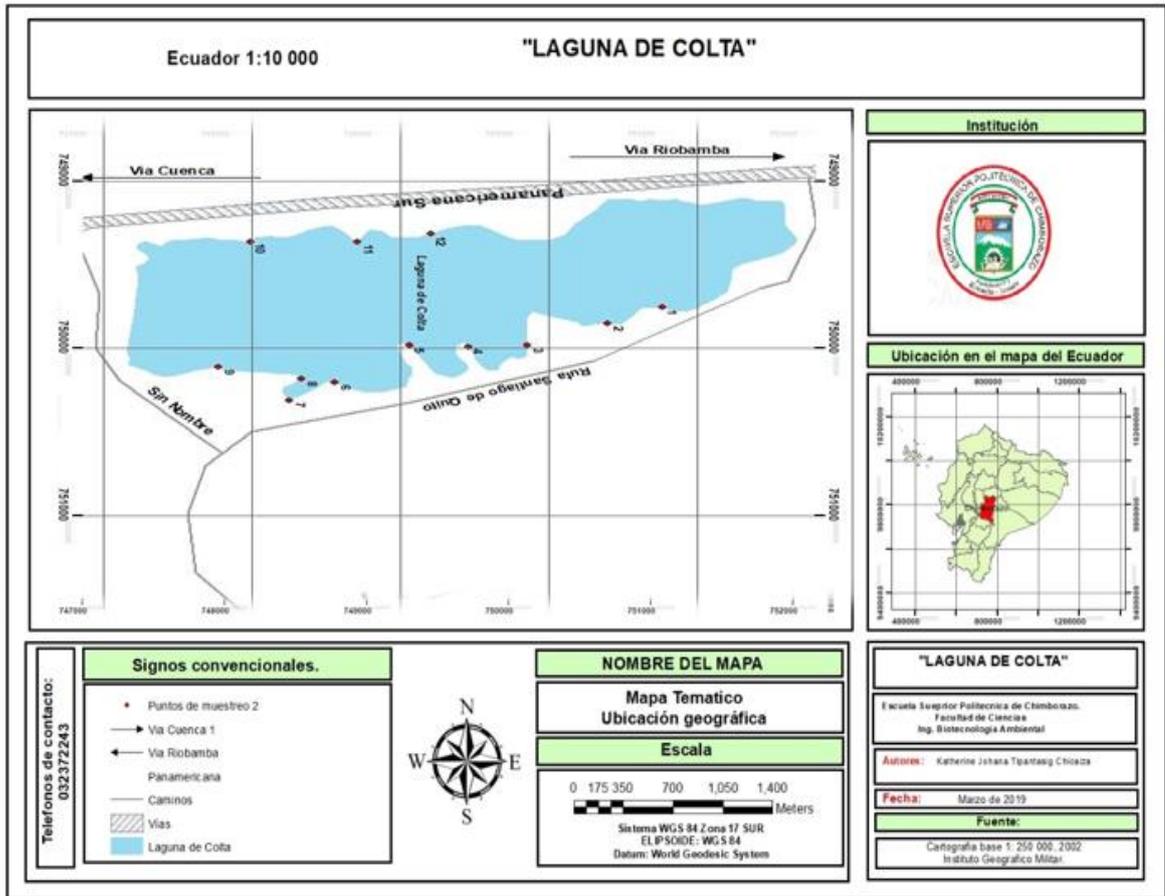
**q** = probabilidad de no ocurrencia

**e** = error

### 2.4.2. Tamaño de la muestra

Las muestras fueron tomadas en la Laguna de Colta que se encuentra ubicada en la parte Noroccidental de la Provincia de Chimborazo, a 18 Km. de la ciudad de Riobamba en la parroquia Santiago de Quito. A una altura de 3280 msnm, con una temperatura promedio entre 12 – 15° C. (Gobierno Municipal de Colta - COLTA, 2009,p.1)

Se realizó un muestreo aleatorio simple para lo cual se tomaron 12 muestras cada una de 100ml alrededor de la laguna de Colta.



**Figura. 1-2.** Puntos de muestreo en la laguna de Colta  
Realizado por: Macas, Paola; Tipantasig Katherine, 2019

## 2.5. Técnicas de recolección de datos

Se realizó el muestreo en la Laguna de Colta. (Figura 2.2)

**Toma de las muestras:** Para la toma de las muestras se utilizaron frascos plásticos con tapa, limpios y estériles, se procedió a introducirlos en el agua, enjuagar el frasco por lo menos tres veces con el agua de la Laguna y luego tomar la muestra.

La muestra será transportada en un cooler al laboratorio manteniendo la temperatura lo más cercana a la que posee la laguna.



**Figura. 2-2** Muestreo del punto 1 y 10

**Realizado por:** Macas, Paola; Tipantasig Katherine, 2019

## **2.6. Determinación del pH**

Para determinar el pH se utilizaron tiras de papel medidoras de pH.

## **2.7. Determinación de la temperatura**

La determinación de la temperatura se realizó con un termómetro de mercurio, el cual se introdujo en la laguna y se mantuvo dentro durante 1 minuto luego se procedió a sacar el termómetro y observar la temperatura indicada.

## **2.8. Análisis de laboratorio**

### **2.8.1. Preparación de los medios de cultivo**

Para la presente investigación se utilizó como medio base el PCA, el cual fue preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante y suplementado de acuerdo a las necesidades del trabajo. (Tabla 1-2)

Para ello se procedió a pesar 23,5 gramos para un litro de agua colocar en un matraz y mover hasta que se disuelva y esterilizar en la autoclave, dejarlo enfriar y poner en las cajas Petri. (Tabla 1-2)

Este medio también será utilizado suplementado con el pesticida en una concentración de 0,5mL/100mL. (Tabla 1-2)

**Tabla 2-2** Preparación de medios de cultivo

	<b>Medio PCA</b>	<b>PCA.AL (Medio agua de la laguna)</b>	<b>Medio PCA suplementado</b>
<b>Agua destilada</b>	1000 ml		1000 ml
<b>Medio</b>	23.5 g/ 1000 ml	23,5 g/ 1000 ml	23,5 g/ 1000 ml
<b>Suplemento glifosato</b>			0,5mL/100mL
<b>Agua de la laguna</b>		1000ml	

Realizado por: Macas, Paola; Tipantasig Katherine, 2019

### 2.8.2. *Siembra de las muestras de agua*

Se realizó la siembra de las muestras de agua para determinar la carga microbiana de dichas muestras, de acuerdo al siguiente protocolo.

De cada muestra obtenida se procedió a realizar diluciones seriadas en base diez, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), y de cada una de esas diluciones se procedió a sembrar 100  $\mu$ L por triplicado en los medios indicados en la tabla 1-2 de acuerdo a la siguiente metodología. (Garibaldi, Santambrosio and Ortega, 2009)

- Se tomó la espátula de vidrio y se le bañó en etanol al 95% posteriormente se flameo de manera que se esterilice.
- Con la pipeta automática se colocaron 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  sobre placas con el medio y con la espátula de vidrio se procedió a extender el volumen abarcando toda la superficie de la placa.
- Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente y 35°C durante 24 horas o hasta obtener crecimiento.
- Una vez transcurridas 24 horas se determinaron las unidades formadoras de colonias.

### 2.8.3. *Aislamiento de los clones bacterianos*

Se realizó el aislamiento de los microorganismos como se indica a continuación. (Mondino, 2012,p,7.)

- Se seleccionaron al azar colonias representativas de cada placa, esencialmente de acuerdo a su tamaño, forma, color y al tiempo de crecimiento.
- Las colonias seleccionadas con un palillo estéril se trasladaron a otra placa con el mismo medio.
- Las placas se incubaron durante 24 horas a las mismas condiciones de temperatura de la cual se obtuvieron (temperatura ambiente y a 35°C).

- Luego de su crecimiento se tomó una nueva placa con agar PCA y con ayuda de palillos estériles se procedió a realizar un nuevo repique de los clones, luego se incubó a las mismas temperaturas ya establecidas anteriormente, el proceso se realizó por los menos 3 veces más para determinar la estabilidad del aislado bacteriano.

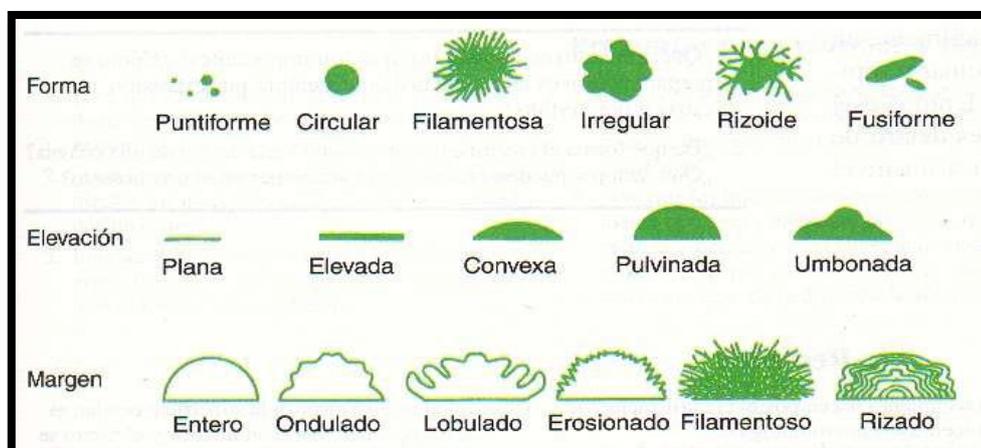
#### 2.8.4. Aislamiento por agotamiento

Posteriormente al último repique cuando ya se estabilizaron los clones, se seleccionaron varias colonias tomando en cuenta el tamaño, forma, color, para proceder a sembrarlas por agotamiento y así obtener clones puros, de acuerdo al siguiente protocolo. (Pineda, 2015,p.1)

- Se flameo el asa bacteriológica, se enfrió y tomó una colonia del tercer repique.
- Con esa asa se procedió a realizar 3 estrías en la parte superior de la caja, se flameo el asa, se la enfrió y se la giro para realizar el mismo procedimiento, pero esta vez desde la última estría, este procedimiento se realizó por lo menos 4 veces, con el fin de obtener colonias aisladas.
- Una vez terminada la siembra por agotamiento la placa fue incubada de 24 a 48 horas a temperatura ambiente y a 35°C.
- Una vez que crecieron se seleccionaron clones aislados los cuales fueron utilizados para hacer la descripción morfológica.

#### 2.8.5. Descripción de la morfología macroscópica de las colonias bacterianas

Se realizó la caracterización macroscópica de los clones aislados en el paso anterior, determinando tamaño forma, color, tiempo de crecimiento, elevación, borde, entre otros. Alain, José; 2012, p.45 (figura 3-2.)



**Figura. 3-2.** Descripción de la morfología de las colonias bacterianas

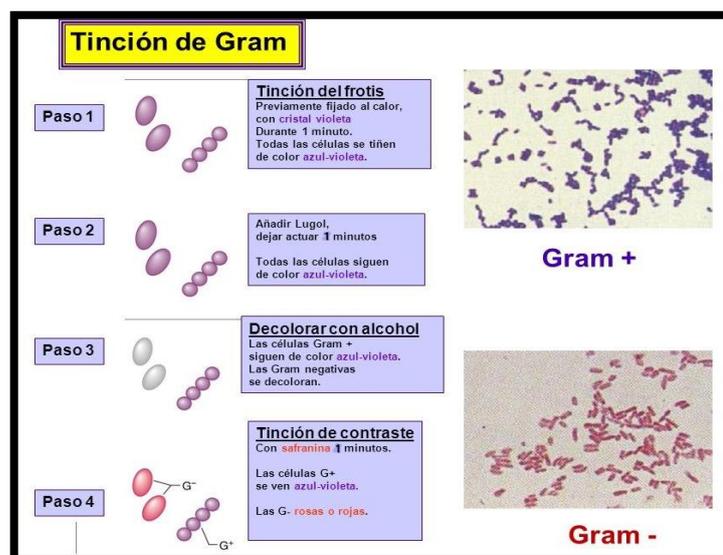
Fuente: Alain, José; 2012, p.45

### 2.8.6. Tinción de GRAM de los aislados bacterianos puros

A partir de los clones bacterianos puros obtenidos anteriormente se procedió a realizar la tinción de Gram para de esta manera comprobar si el aislamiento se realizó correctamente, es decir; si solo se encontraban cocos o bacilos Gram (+) o Gram (-).

Se realizó Tinción de GRAM de los aislados bacterianos puros de acuerdo al siguiente protocolo. (Rodríguez, 2017,p.1)

- Sobre un portaobjeto se colocó una gota de agua destilada, con un asa de platino se procedió a tomar un clon bacteriano aislado y a extenderlo.
- Se fijó el extendido pasándolo 3 veces por la flama.
- Se colocó sobre el extendido el reactivo cristal violeta, y se lo dejó actuar durante 1 minuto, se procedió a lavar con agua destilada el portaobjetos evitando que se pierda el extendido.
- Se colocó sobre el extendido el reactivo de lugol, se lo dejó actuar por 1 minuto, y se procedió a lavarlo con agua destilada para quitar el exceso del mismo.
- Se decoloro la muestra con una solución de alcohol etílico-acetona durante 30 segundos y se procedido a lavar con agua destilada.
- Se cubrió la muestra con el reactivo safranina, se dejó actuar por un minuto, se lavó con agua destilada y de dejó secar.
- Para terminar, se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la muestra y se observó en el microscopio con lente de 100X.

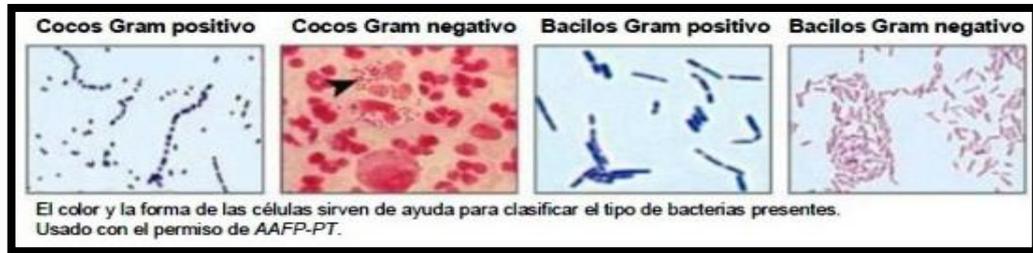


**Figura. 4-2. Tinción Gram**

Fuente:(100CIA.SITE, 2018,p.3)

### 2.8.7. Descripción de la morfología microscópica de las colonias microbianas

Se procedió a realizar la observación en el microscopio y determinar si son cocos o bacilos Gram (+) o Gram (-). (Figura 5-2)



**Figura. 5-2.** Descripción de la morfología microscópica de las colonias microbianas

Fuente:(Molina, 2015,p.1)

### 2.8.8. Evaluación de la tolerancia de los clones aislados al glifosato

Para la determinación de la tolerancia al pesticida se preparó el medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de glifosato (0,5; 1; 2; 3; 4; 5 ml x 100 ml de medio) y sobre estos medios se sembraron los clones a ser evaluados sucesivamente hasta obtener un efecto inhibitorio en 48 horas.

### 2.8.9. Evaluación de la tolerancia de las bacterias al Paraquat

Para la determinación de la tolerancia al pesticida se preparó el medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de paraquat (1; 2; 3; ml x 100 ml de medio) y sobre estos medios se sembraron los clones a ser evaluados sucesivamente hasta obtener un efecto inhibitorio en 48 horas.

### 2.8.10. Evaluación de la resistencia a antibióticos

La evaluación de la resistencia a antibióticos que escogieron aquellos clones que presentaron mayor tolerancia al glifosato y paraquat, utilizando el Método de suspensión directa de colonias o Kirby-Bauer modificado. (Taroco, Seija and Vignoli, 2008,p.4)

- Se colocó entre 4 y 5 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo. Se tomó con un asa bacteriológica la colonia y se suspenden en el tubo hasta alcanzar una turbidez comparable a la solución de Mc Farland 0.5.

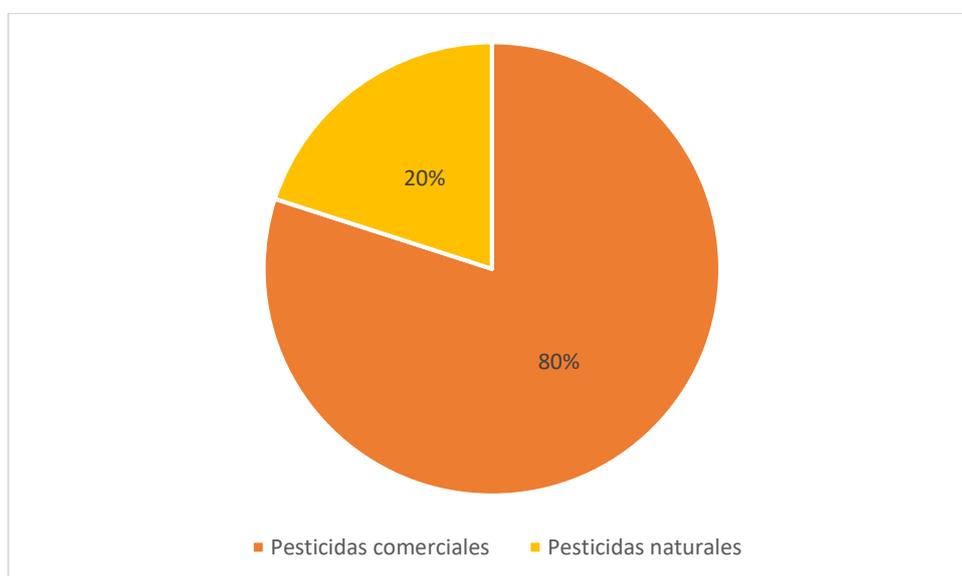
- Se Introdujo un hisopo estéril en el inóculo bacteriano preparado, de manera de empaparlo completamente.
- Se sembró la placa de PCA de manera de obtener un crecimiento homogéneo, para lo cual se estría con el hisopo abarcando toda la superficie de la misma.
- Luego se repitió el procedimiento rotando la placa cuatro veces.
- Se colocaron los discos de los antibióticos Streptomycin S10, Oxacillin Ox1, Neomicina NN, Methicillin ME5, Kamamycin K30, Cefazolin CZ30, Ceftazidime CAZ30 con una pinza estéril cada antibiótico que corresponda para las bacterias Gram positiva o Gram negativas, se debe considerar que deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de manera de que no se choquen los halos de inhibición.
- Una vez sobre el agar se presionó los discos levemente para que queden adheridos al mismo.
- Luego de colocados los discos las placas se incubaron a 35°C y a temperatura ambiente durante 24 horas.
- Se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. Aplicación de la encuesta

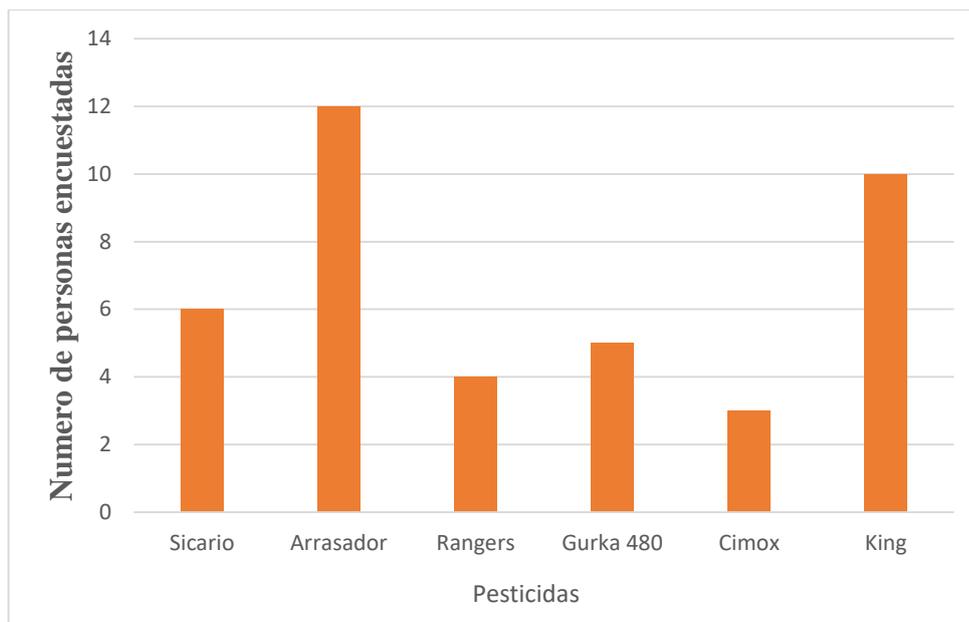
Para determinar el pesticida con el cual se trabajó en esta investigación se realizó una encuesta a 50 personas, moradores de los sectores aledaños a la laguna de colta. Los resultados se muestran a continuación.



**Gráfico 1-3.** Pesticidas comerciales y naturales utilizados en los cultivos que se encuentran alrededor de la laguna de Colta

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La encuesta se realizó según la fórmula establecida a 50 personas, en los resultados obtenidos mostró que de las 50 personas encuestadas el 80% (40) personas utilizan pesticidas comerciales, los más utilizados por la población el Sicario, Arrasador, Rangers, Gurka480, Cimox y King y el 20% (10) personas utilizan pesticidas naturales como cal y ceniza.



**Grafico 2-3.** Pesticidas utilizados en los cultivos que se encuentran alrededor de la Laguna Colta  
 Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

El pesticida más utilizado actualmente en los cultivos es el Arrasador que tiene como principio activo el glifosato con un total del 30% (12) encuestados razón por la cual en esta investigación se utilizó este pesticida.

Otro pesticida utilizado en la presente investigación es el King con el 25% (10) encuestados este pesticida que tiene como principio activo el paraquat. La frecuencia de utilización de los pesticidas es cada 3 meses.

### 3.2. Recuento de los microorganismos presentes en la laguna de Colta

Para la evaluación de la microbiota presente en la laguna de Colta se sembraron muestras de agua en medio PCA en tres condiciones diferentes  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$ . Los resultados se muestran a continuación.

Luego de haber sembrado cada una de las muestras en placas con medio PCA e incubado a temperatura ambiente y  $35^{\circ}\text{C}$  se obtuvieron niveles de crecimiento variado (tabla 3-3)

**Tabla 3-3** Estimación del crecimiento bacteriano de las Muestras (A –F) inoculadas sobre medio PCA e incubadas a Temperatura ambiente y 35°C.

Muestra	Dilución	Tiempo(H) a T Ambiente					Total UFC/mL	Tiempo(H) a T 35°C					Total UFC/mL
		24	48	72	120	144		24	48	72	120	144	
MA	10 <sup>-1</sup>	0	5	10	15	22	2200	0	0	0	2	2	200
	10 <sup>-3</sup>	0	0	1	1	2	20000	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>11100</b>						<b>200</b>
MB	10 <sup>-1</sup>	0	11	22	35	47	4700	12	13	14	16	20	200
	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>4700</b>						<b>200</b>
MC	10 <sup>-1</sup>	0	8	17	27	36	3600	1	5	9	17	22	2200
	10 <sup>-3</sup>	0	0	1	1	2	20000	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>11100</b>						<b>200</b>
MD	10 <sup>-1</sup>	1	7	11	17	23	2300	8	10	14	14	29	2900
	10 <sup>-3</sup>	0	2	2	4	6	60000	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1000000
<b>Total</b>							<b>31150</b>						<b>501450</b>
ME	10 <sup>-1</sup>	12	33	37	37	39	3900	11	16	19	20	20	2000
	10 <sup>-3</sup>	0	1	3	3	3	30000	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1000000
<b>Total</b>							<b>16950</b>						<b>501000</b>
MF	10 <sup>-1</sup>	0	2	7	11	14	1400	1	4	4	4	4	400
	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>1400</b>						<b>400</b>

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

De las seis muestras de agua evaluadas, con excepción de las muestras D y E el mayor crecimiento se obtuvo a temperatura ambiente, suponemos que esto se debe a que la microbiota presente en las muestras posee una temperatura óptima de crecimiento cercana de la laguna (16°C).

### 3.2.1. Resultado del crecimiento de las muestras obtenidas de la Laguna de Colta (A-F) crecidas a Temperatura ambiente y 35°C en PCA.AL

Para evaluar el posible efecto positivo del agua de la laguna sobre el crecimiento bacteriano se prepararon placas con medios suspendidos en agua de la laguna y se procedió a sembrar dos diluciones (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-5</sup>) los resultados se muestran en la tabla (4-3)

**Tabla 4-3** Estimación del crecimiento bacteriano de las Muestras (A –F) inoculadas sobre medio PCA.AL e incubadas a Temperatura ambiente y 35°C.

Muestra	Dilución	Tiempo(H) a T Ambiente					Total UFC/mL	Tiempo(H) a T 35°C					Total UFC/mL
		24	48	72	120	144		24	48	72	120	144	
MA	10 <sup>-1</sup>	0	0	0	8	10	1000	5	7	7	8	8	800
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>1000</b>						<b>800</b>
MB	10 <sup>-1</sup>	0	17	50	115	115	11500	34	70	77	89	100	10000
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>11500</b>						<b>10000</b>
MC	10 <sup>-1</sup>	0	47	67	84	85	8500	26	66	79	79	87	8700
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>8500</b>						<b>8700</b>
MD	10 <sup>-1</sup>	0	2	9	22	26	2600	3	9	11	12	13	1300
	10 <sup>-5</sup>	0	0	2	2	2	20000	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>11300</b>						<b>1300</b>
ME	10 <sup>-1</sup>	0	24	35	48	53	5300	7	19	19	21	21	2100
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	2	2	20000	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							12650						2100
MF	10 <sup>-1</sup>	0	9	17	18	20	2000	3	6	8	85	100	10000
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>2000</b>						<b>10000</b>

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

De las seis muestras de agua evaluadas, con excepción de las muestras C y F el mayor crecimiento se obtuvo a temperatura ambiente. Suponemos que esto se debe a que las bacterias que habitan el agua de la laguna poseen temperatura óptima de crecimiento alrededor de (16 ° C).

Los valores de crecimientos obtenidos para las muestras cultivadas en medio PCA con el agua de la laguna y con agua destilada no mostraron diferencias significativas.

### 3.2.2. Resultados de crecimiento de las muestras obtenidas de la laguna de Colta (A -F) crecidas a Temperatura ambiente y 35°C en PCA suplementado con glifosato

Para evaluar el posible efecto del glifosato sobre el crecimiento bacteriano se prepararon placas con medios suspendidos en agua destilada y suplementada con glifosato, y se procedió a sembrar tres diluciones (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup>) los resultados se muestran en las tablas (5-3)

**Tabla 5-3** Estimación del crecimiento bacteriano de las Muestras (A-F) inoculado sobre medio PCA suplementado con e incubada a Temperatura ambiente y 35°C

Muestra	Dilución	Tiempo(H) a T Ambiente					Total UFC/mL	Tiempo(H) a T 35°C					Total UFC/mL
		24	48	72	120	144		24	48	72	120	144	
MA	10 <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>							<b>0</b>						<b>0</b>
MB	10 <sup>-1</sup>	0	0	0	0	2	200	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>						<b>0</b>						<b>0</b>	
MC	10 <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>						<b>0</b>						<b>0</b>	
MD	10 <sup>-1</sup>	0	2	2	2	2	200	0	3	3	4	4	400
	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>						<b>200</b>						<b>400</b>	
ME	10 <sup>-1</sup>	0	1	1	1	1	100	0	1	1	1	1	100
	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>						<b>100</b>						<b>100</b>	
MF	10 <sup>-1</sup>	0	0	2	2	2	200	0	0	2	2	2	200
	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>						<b>200</b>						<b>200</b>	

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación del crecimiento en medio suplementado con glifosato (0,5mL/100mL) al compararlo con el crecimiento en PCA mostro un crecimiento menor a las dos temperaturas, tomando en cuenta que en la muestra A y C no se observó ningún crecimiento. En las muestras B se obtuvo crecimiento a temperatura ambiente y a 35°C no mostro ningún crecimiento, en la muestra D se observó mayor crecimiento a 35°C, mientras que en las muestras E y F el crecimiento fue equitativo.

En el estudio realizado por Vargas (2014) “Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de aguas de la Laguna de Colta de la zona central del Ecuador” se encontró que en la Laguna de Colta existe crecimiento de bacterias dando como resultado 348 UFC/ml, suponemos que la inhibición en el crecimiento de las bacterias es debido a la presencia del glifosato.

### 3.3. Aislamiento y estabilización de los clones bacterianos

Luego de haber realizado el conteo de cada una de las muestras y realizado 3 repicas para estabilizar los clones se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación en las siguientes tablas (6-3,7-3,8-3,9-3,10-3,11-3)

**Tabla 6-3** Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA a Temperatura ambiente

Muestra	Clon	Repique 1	Repique 1	Repique 3
MA <sup>-1</sup>	24a	+	+	+
	25a	+	+	+
	38b	+	+	+
	39b	+	+	+
	40b	+	+	+
	41b	+	+	+
MA <sup>-3</sup>	7b	+	+	-
MB <sup>-1</sup>	1a	+	+	+
	2a	+	+	+
	3a	+	+	+
	4a	+	+	+
	5a	+	+	-
	33b	+	+	+
	34b	+	+	+
	35b	+	+	+
	36b	+	+	+
	37b	+	+	+
MB <sup>-5</sup>	21a	+	+	+
	22a	+	-	-
	23a	+	-	-
MC <sup>-1</sup>	24b	+	+	+
	25b	+	+	+
	26b	+	+	-
	27b	+	+	+
	28b	+	+	+
	29b	+	+	+
	30b	+	+	+
	31b	+	+	+
	32b	+	+	+
MD <sup>-1</sup>	17b	+	+	+
	18b	+	+	+
	19b	+	+	+
	20b	+	+	+
	21b	+	+	+
	22b	+	+	+
	23b	+	+	+
MD <sup>-3</sup>	1b	+	+	+
	2b	+	+	+
	3b	+	+	-
	4b	+	+	+
	6a	+	+	+
	7a	+	+	+

<b>ME<sup>-1</sup></b>	8a	+	+	+
	9a	+	+	-
	12b	+	+	+
	13b	+	+	+
	14b	+	+	+
	15b	+	+	+
	16b	+	+	+
<b>ME<sup>-3</sup></b>	5b	-	-	-
	6b	+	+	+
<b>MF<sup>-1</sup></b>	8b	+	+	+
	9b	+	+	+
	10a	+	+	+
	10b	+	+	+
	11a	+	+	+
	11b	+	+	+
	12a	+	+	+
	13a	+	+	+
	14a	+	+	+
	15a	+	+	+
	16a	+	+	+
	17a	+	+	+
	18a	+	+	+
19a	+	+	+	
20a	+	+	+	
<b>MF<sup>-5</sup></b>	26a	+	+	+
	27a	+	+	+
	28a	+	+	+
	29a	+	+	-
	30a	+	+	-

+ = Creció

- = No creció

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

**Tabla 7-3** Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA a 35°C

<b>Muestra</b>	<b>Clon</b>	<b>Repique 1</b>	<b>Repique 2</b>	<b>Repique 3</b>
<b>MB<sup>-1</sup></b>	5a	+	+	+
	6a	+	+	+
	7a	-	-	-
	8a	-	-	-
	9a	+	+	-
	27b	+	+	+
	28b	-	-	-
	29b	-	-	-
	30b	-	-	-
<b>MB<sup>-3</sup></b>	31b	+	+	+
	32b	+	+	+
	33b	+	+	+
	34b	+	+	+
	13a	-	-	-
	14a	-	-	-
	15a	+	+	+
	16a	+	+	+

<b>MC<sup>-1</sup></b>	17a	+	+	+
	18a	+	+	-
	19a	+	+	+
	20a	+	+	+
	18b	+	+	+
	19b	+	+	+
	20b	+	+	+
	21b	+	+	+
	22b	+	+	+
	23b	+	+	+
	24b	+	+	+
	25b	-	-	-
	26b	+	-	-
	<b>MC<sup>-3</sup></b>	10a	+	+
11a		+	-	-
12a		+	+	+
<b>MD<sup>-1</sup></b>	14b	+	+	+
	15b	+	+	+
	16b	+	+	+
	21a	-	-	-
	22a	+	+	+
	23a	-	-	-
	24a	+	-	-
	25a	+	-	-
<b>MD<sup>-5</sup></b>	1a	+	+	+
	2a	+	+	+
<b>ME<sup>-1</sup></b>	5b	+	+	+
	6b	+	+	+
	7b	+	+	+
	8b	+	+	+
	9b	+	+	+
	10b	+	+	+
	11b	+	+	+
	12b	+	+	+
	13b	+	+	+
	26a	-	-	-
	27a	+	+	-
	28a	+	+	-
	29a	-	+	-
	30a	+	+	+
<b>ME<sup>-5</sup></b>	35b	-	-	-
<b>MF<sup>-1</sup></b>	1b	+	+	+
	2b	+	+	+
	3b	+	+	+
	4b	+	+	+
<b>MF<sup>-3</sup></b>	3a	-	-	-
	4a	-	-	-

+ = Creció

-=No creció

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La estabilización de clones de PCA se inició con 135 clones de los cuales 71 clones provenían de temperatura ambiente y 64 clones de 35°C observándose que los clones que mostraron mayor crecimiento fueron provenientes de la temperatura ambiente con un 86% (61), en el caso de 35°C

la reducción fue mayor con un 36% (23), esto abala la observación hecha anteriormente de la características psicrófilas de las bacterias aisladas.

**Tabla 8-3** Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA.AL a Temperatura ambiente

<b>Muestra</b>	<b>Clon</b>	<b>Repique 1</b>	<b>Repique 2</b>	<b>Repique 3</b>
<b>MA<sup>-1</sup></b>	<i>1a</i>	+	+	+
	<i>2a</i>	+	+	+
	<i>3a</i>	+	+	+
	<i>4a</i>	+	+	+
	<i>26b</i>	+	+	+
	<i>27b</i>	+	+	+
	<i>28b</i>	+	+	+
	<i>29b</i>	+	+	+
	<i>30b</i>	+	+	+
	<i>31b</i>	+	+	+
	<i>32b</i>	+	+	+
<b>MB<sup>-1</sup></b>	<i>5a</i>	+	+	+
	<i>6a</i>	+	+	+
	<i>7a</i>	+	+	+
	<i>8a</i>	+	+	+
	<i>21b</i>	+	+	+
	<i>22b</i>	+	+	+
	<i>23b</i>	+	+	+
	<i>24b</i>	+	+	+
	<i>25b</i>	+	+	+
<b>MC<sup>-1</sup></b>	<i>9a</i>	+	+	+
	<i>13b</i>	+	+	+
	<i>14b</i>	+	+	+
	<i>15b</i>	+	+	+
	<i>16b</i>	-	-	-
	<i>17b</i>	+	+	+
	<i>18b</i>	+	+	+
	<i>19b</i>	+	+	-
	<i>20b</i>	-	-	-
<b>MD<sup>-1</sup></b>	<i>6b</i>	+	-	-
	<i>7b</i>	+	-	-
	<i>8b</i>	+	+	+
	<i>9b</i>	+	+	-
	<i>10b</i>	+	+	+
	<i>11b</i>	+	+	+

	<i>12b</i>	+	+	+
	<i>10a</i>	+	+	+
	<i>11a</i>	+	+	+
	<i>12a</i>	+	+	+
<b>ME<sup>-1</sup></b>	<i>13a</i>	+	+	+
	<i>14a</i>	+	+	+
	<i>15a</i>	+	+	+
	<i>16a</i>	+	+	+
<b>MF<sup>-1</sup></b>	<i>17a</i>	+	+	+
	<i>18a</i>	+	+	+
	<i>19a</i>	+	+	+
	<i>20a</i>	+	+	+

+ = Creció

-=No creció

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

**Tabla 9-3** Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA.AL a 35°C

<b>Muestra</b>	<b>Clon</b>	<b>Repique 1</b>	<b>Repique 2</b>	<b>Repique 3</b>
<b>MA<sup>-1</sup></b>	<i>24a</i>	+	+	+
	<i>25a</i>	+	+	+
	<i>46b</i>	+	+	+
	<i>47b</i>	+	+	+
	<i>48b</i>	-	-	-
<b>MB<sup>-1</sup></b>	<i>1a</i>	+	+	+
	<i>2a</i>	+	+	+
	<i>3a</i>	+	+	+
	<i>4a</i>	+	+	+
	<i>5a</i>	+	+	+
	<i>1b</i>	+	+	+
	<i>2b</i>	+	+	+
	<i>3b</i>	+	+	+
	<i>4b</i>	+	+	+
	<i>5b</i>	+	+	+
	<i>6b</i>	+	+	+
	<i>7b</i>	+	+	+
	<i>8b</i>	+	+	+
	<i>9b</i>	+	+	+
	<i>10b</i>	+	+	+
	<i>11b</i>	+	+	+
	<i>12b</i>	+	+	+
	<i>13b</i>	+	+	+
<i>14b</i>	+	+	+	
<i>15b</i>	+	+	+	
<i>16b</i>	+	+	+	
<b>MB<sup>-5</sup></b>	<i>21a</i>	+	+	+
	<i>22a</i>	+	+	+
	<i>23a</i>	+	+	+

<b>MC<sup>-1</sup></b>	<i>17b</i>	+	+	+
	<i>18b</i>	+	+	+
	<i>19b</i>	+	+	+
	<i>20b</i>	+	+	+
	<i>21b</i>	+	+	+
	<i>22b</i>	+	+	+
	<i>23b</i>	+	+	+
	<i>24b</i>	+	+	+
	<i>25b</i>	+	+	+
	<i>26b</i>	+	+	+
	<i>27b</i>	+	+	+
	<i>28b</i>	+	+	+
	<i>29b</i>	+	+	+
	<i>30b</i>	+	+	+
<b>ME<sup>-1</sup></b>	<i>6a</i>	+	+	+
	<i>7a</i>	+	+	+
	<i>8a</i>	+	+	+
	<i>9a</i>	+	+	-
	<i>31b</i>	+	+	+
	<i>32b</i>	+	+	+
	<i>33b</i>	+	+	-
	<i>34b</i>	+	+	+
	<i>35b</i>	+	+	+
	<i>36b</i>	+	+	+
<b>MF<sup>-1</sup></b>	<i>10a</i>	+	+	+
	<i>11a</i>	+	+	+
	<i>12a</i>	+	+	+
	<i>13a</i>	+	+	+
	<i>14a</i>	+	+	+
	<i>15a</i>	+	+	+
	<i>16a</i>	+	+	+
	<i>17a</i>	+	+	+
	<i>18a</i>	+	+	+
	<i>19a</i>	+	+	+
	<i>20a</i>	+	+	+
	<i>39b</i>	+	+	+
	<i>40b</i>	+	+	+
	<i>41b</i>	+	+	+
	<i>42b</i>	+	+	+
<b>MF<sup>-5</sup></b>	<i>26a</i>	+	+	+
	<i>27a</i>	+	+	+
	<i>28a</i>	+	+	+
	<i>29a</i>	+	+	+
	<i>30a</i>	+	+	+
	<i>31a</i>	+	+	+
	<i>32a</i>	+	+	+
	<i>33a</i>	+	+	+
<i>34a</i>	+	+	+	

	<i>35a</i>	+	+	+
	<i>36a</i>	+	+	+
	<i>37a</i>	+	+	+

+ = Creció

-=No creció

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

En las tablas (8-3, 9-3) se evaluó el crecimiento de los clones en medio PCA preparado con agua de la Laguna, no se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de crecimiento, se inició con 47 clones a temperatura ambiente y con 85 a 35°C, en donde se obtuvo un crecimiento hasta el tercer repique a temperatura ambiente del 86% y a 35°C el 92%.

**Tabla 10-3** Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA suplementado con glifosato a Temperatura ambiente

Muestra	Clon	Repique 1	Repique 1	Repique 3
MA <sup>-1</sup>	5b	+	+	+
	16a	-	-	-
	17a	+	+	-
MB <sup>-1</sup>	10a	-	-	-

	<i>11a</i>	-	-	-
	<i>12a</i>	-	-	-
	<i>12b</i>	+	+	+
	<i>13a</i>	+	+	-
	<i>14a</i>	-	-	-
	<i>14b</i>	+	+	+
	<i>15a</i>	-	-	-
<b>MC<sup>-3</sup></b>	<i>5a</i>	-	-	-
	<i>6a</i>	-	-	-
	<i>7a</i>	-	-	-
	<i>8a</i>	-	-	-
	<i>9a</i>	-	-	-
<b>MD<sup>-1</sup></b>	<i>6b</i>	+	+	+
	<i>7b</i>	+	+	+
	<i>9b</i>	+	+	+
<b>MD<sup>-3</sup></b>	<i>1a</i>	-	-	-
	<i>2a</i>	+	+	+
	<i>3a</i>	+	+	+
	<i>4a</i>	-	-	-
<b>ME<sup>-5</sup></b>	<i>18a</i>	+	+	-
	<i>19a</i>	-	-	-
	<i>20a</i>	-	-	-
<b>MF<sup>-1</sup></b>	<i>1b</i>	+	+	+
	<i>3b</i>	+	+	+
	<i>21a</i>	-	-	-
	<i>22a</i>	-	-	-
	<i>23a</i>	-	-	-
	<i>24a</i>	-	-	-

+ = Creció

- = No creció

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

**Tabla 11-3** Resultado de la estabilización de los clones bacterianos aislados del PCA suplementado con glifosato a 35°C

<b>Muestra</b>	<b>Clon</b>	<b>Repique 1</b>	<b>Repique 2</b>	<b>Repique 3</b>
<b>MA<sup>-1</sup></b>	<i>8b</i>	+	+	+
	<i>37a</i>	-	-	-
	<i>38a</i>	-	-	-
<b>MB<sup>-1</sup></b>	<i>5a</i>	+	+	+
	<i>6a</i>	+	+	+
	<i>7a</i>	-	-	-
	<i>8a</i>	-	-	-
	<i>9a</i>	+	+	-
<b>MC<sup>-1</sup></b>	<i>13a</i>	-	-	-
	<i>14a</i>	-	-	-
	<i>15a</i>	+	+	+
	<i>16a</i>	+	+	+
	<i>17a</i>	+	+	+
	<i>18a</i>	+	+	-
	<i>19a</i>	+	+	+
	<i>20a</i>	+	+	+
<b>MC<sup>-3</sup></b>	<i>10a</i>	+	+	+
	<i>11a</i>	+	-	-

	<i>12a</i>	+	+	+
<b>MD<sup>-1</sup></b>	<i>4b</i>	+	+	+
	<i>5b</i>	+	+	+
	<i>6b</i>	+	+	+
	<i>7b</i>	+	+	+
	<i>21a</i>	-	-	-
	<i>22a</i>	+	+	+
	<i>23a</i>	-	-	-
	<i>24a</i>	+	-	-
	<i>25a</i>	+	-	-
	<b>MD<sup>-3</sup></b>	<i>39a</i>	-	-
<i>40a</i>		-	-	-
<i>14b</i>		+	+	+
<b>MD<sup>-5</sup></b>	<i>1a</i>	+	+	+
	<i>2a</i>	+	+	+
<b>ME<sup>-1</sup></b>	<i>3b</i>	+	+	+
	<i>25b</i>	+	+	+
	<i>26a</i>	-	-	-
	<i>27a</i>	+	+	-
	<i>28a</i>	+	+	-
	<i>29a</i>	-	+	-
	<i>30a</i>	+	+	+
	<i>31a</i>	-	-	-
	<i>32a</i>	-	-	-
<b>ME<sup>-3</sup></b>	<i>33a</i>	-	-	-
	<i>34a</i>	-	-	-
	<i>35a</i>	-	-	-
	<i>36a</i>	-	-	-
<b>MF<sup>-1</sup></b>	<i>1b</i>	+	+	+
	<i>2b</i>	+	+	+
	<i>9b</i>	+	+	+
<b>MF<sup>-3</sup></b>	<i>3a</i>	-	-	-
	<i>4a</i>	-	-	-

+ = Creció

-=No creció

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

El proceso de estabilización de clones de PCA con glifosato (0,5mL/100mL) se inició con 32 clones a temperatura ambiente de ellos lograron sobrevivir hasta el tercer repique 10 clones lo que representa el 32%.

A 35°C se inició con 51 clones de los cuales sobrevivieron 24 clones lo cual representa el 47%, demostrando de esta forma que el mayor crecimiento con glifosato se obtuvo a 35°C.

La evaluación del crecimiento en las 3 condiciones (PCA, PCA.AL y PCA suplementado con glifosato) mostro que los clones que tuvieron mayor crecimiento fueron los provenientes del medio PCA a temperatura ambiente el cual inicio con 71 clones y el 86% (61 clones).

Un resultado similar fue obtenido para PCA.AL, cultivado tanto a temperatura ambiente como a 35°C donde se obtuvo un crecimiento de 86% y 87% respectivamente.

El efecto toxico del glifosato fue claramente evidenciado en este experimento donde los clones presentaron una mortalidad del 68% a temperatura ambiente y 53% a 35

### 3.4. Aislamiento por agotamiento e identificación morfológica

#### 3.4.1. Caracterización morfológica macroscópica de los clones aislados

La caracterización de los clones mostró un comportamiento variado porque existió una diferencia significativa en cada una de sus características como el tamaño, color, bordes y consistencia, los cuales se describen en las siguientes tablas.

**Tabla 12-3** Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA a temperatura Ambiente

Muestra	Clon	Morfología						
		Tamaño	Forma	Color	Bordes	Consistencia	Elevación	Superficie
MA <sup>-1</sup>	24 <sup>a</sup>	Grande	Circular	Amarillo transparente	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
	39 <sup>b</sup>	Mediano	Circular	Amarillo transparente	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
MB <sup>-1</sup>	1 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Amarillo	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	2 <sup>a</sup>	Pequeño	Circular	Blanco	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	33 <sup>b</sup>	Pequeño	Circular	Naranja	Enteros	Cremosa	Elevadas	Lisa
MB <sup>-5</sup>	21 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Naranja	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	22 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco transparente	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
MC <sup>-1</sup>	31 <sup>b</sup>	Pequeño	Circular	Blanco	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	32 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Rosado	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
MD <sup>-1</sup>	17 <sup>b</sup>	Mediano	Circular	Naranja	Enteros	Cremosa	Elevadas	Lisa
MD <sup>-3</sup>	1 <sup>b</sup>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevadas	Lisa
ME <sup>-1</sup>	6 <sup>a</sup>	Grande	Circular	Blanco transparente	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
	7 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	8 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa

	9 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	13b	Mediano	Circular	Amarillo transparente	Enteros	Cremosa	Elevadas	Lisa
	14b	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	15b	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>MF<sup>-1</sup></b>	12 <sup>a</sup>	Pequeño	Circular	Amarillo	Enteros	Cremosa	No Elevada	Lisa
	15 <sup>a</sup>	Pequeño	Circular	Amarillo	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	16 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Enteros	Cremosa	No Elevada	Lisa
	18 <sup>a</sup>	Pequeño	Circular	Melón	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	19 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Irregulares	Cremosa	No Elevada	Lisa
	20 <sup>a</sup>	Pequeño	Circular	Blanco	Irregulares	Cremosa	No Elevada	Lisa

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

**Tabla 13-3** Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA 35°C

Muestra	Clon	Morfología						
		Tamaño	Forma	Color	Bodes	Consistencia	Elevación	Superficie
<b>MB<sup>-1</sup></b>	27b	Grande	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	28b	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>MB<sup>-3</sup></b>	32b	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>MC<sup>-1</sup></b>	13 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Irregulares	Cremosa	Elevada	Rugosa
	14 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Enteros	Cremosa	No Elevada	Rugosa
	16 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Enteros	Cremosa	No Elevada	Lisa
	19 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Irregulares	Cremosa	No Elevada	Lisa
	18b	Mediano	Circular	Blanco	Enteros	Cremosa	No Elevada	Rugosa
	21b	Grande	Circular	Amarillo transparente	Irregulares	Mucosa	Elevadas	Lisa
	22b	Pequeño	Circular	Rojo	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa

<b>MC<sup>-3</sup></b>	10 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Blanco	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	12 <sup>a</sup>	Pequeño	Circular	Amarillo	Enteros	Cremosa	No Elevada	Lisa
<b>MD<sup>-1</sup></b>	17 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Amarillo transparente	Irregulares	Mucosa	Elevadas	Lisa
	21 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Amarillo	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>MD<sup>-5</sup></b>	1 <sup>a</sup>	Mediano	Circular	Amarillo	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>ME<sup>-1</sup></b>	5 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Naranja	Enteros	Cremosa	Elevadas	Lisa
	6 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	8 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	9 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Amarillo	Irregulares	Cremosa	Elevadas	Lisa
	11 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Blanco transparente	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
	12 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	26 <sup>a</sup>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
27 <sup>a</sup>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa	
<b>ME<sup>-5</sup></b>	35 <sup>b</sup>	Pequeño	Circular	Rojo	Enteros	Cremosa	Elevadas	Lisa
<b>MF<sup>-1</sup></b>	1 <sup>b</sup>	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Mucosa	Elevadas	Lisa
	2 <sup>b</sup>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	4 <sup>b</sup>	Grande	Circular	Amarillo transparente	Irregulares	Mucosa	Elevada	Lisa

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación morfológica de los 24 clones aislados a temperatura ambiente mostró el predominio del tamaño mediano con un 54%, en la forma el 100% fueron circulares, , en cuanto al color el que sobresalió fue el blanco (32%), con respecto a los bordes se observó que no había diferencia, el 50% era regular y el otro 50% irregular, con respecto a la consistencia el mayor número de colonias obtenidas fueron cremosas con un 92% , en el caso de la elevación sobresalen las elevadas con un 83% y para terminar la superficie es lisa para el 100%.

En los 27 clones aislados a 35°C se observó el predominio del tamaño mediano con un 44%, en relación a la forma el 100% fueron circulares, color el que prevalece es el blanco cremoso con un 33%, con relación a los bordes predomina los enteros con un 56%, en relación a la consistencia en su mayoría las cremosas con un 81%, en cuanto a la elevación sobresalen las elevadas con un 81% y para finalizar la superficie es lisa con el 100%.

**Tabla 14-3** Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA.AL a temperatura ambiente

Muestra	Clon	Morfología						
		Tamaño	Forma	Color	Bordes	Consistencia	Elevación	Superficie
MB <sup>-1</sup>	1a	Pequeño	Circular	Amarillo transparente	Enteros	Mucosa	No Elevada	Lisa
	2a	Mediano	Circular	Blanco cremosa	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	3a	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	4a	Pequeño	Circular	Melón	Irregulares	Creмоса	Elevada	Lisa
	1b	Mediano	Circular	Amarillo transparente	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	2b	Pequeño	Circular	Melón	Irregulares	Creмоса	Elevada	Lisa
	3b	Mediano	Circular	Blanco	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	4b	Mediano	Circular	Blanco transparente	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	5b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	6b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	8b	Pequeño	Circular	Café oscuro	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	9b	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	No Elevada	Lisa
	10b	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	11b	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
12b	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa	
13b	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa	
14b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa	

	<i>15b</i>	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
	<i>16b</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	No Elevada	Lisa
<b>MB<sup>-5</sup></b>	<i>21a</i>	Mediano	Circular	Amarillo	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
<b>MC<sup>-1</sup></b>	<i>17b</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Creмоса	No Elevada	Lisa
	<i>18b</i>	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>19b</i>	Mediano	Circular	Creма	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>20b</i>	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>21b</i>	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>22b</i>	Pequeño	Circular	Melón	Irregulares	Mucosa	Elevada	Lisa
	<i>24b</i>	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>25b</i>	Pequeño	Circular	Blanco	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
<b>ME<sup>-1</sup></b>	<i>6a</i>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>7a</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>8a</i>	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>9a</i>	Mediano	Circular	Amarillo	Irregulares	Creмоса	Elevada	Lisa
<b>MF<sup>-1</sup></b>	<i>10a</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Mucosa	Elevada	Lisa
	<i>11a</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Mucosa	Elevada	Lisa
	<i>13a</i>	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>14a</i>	Grande	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>15a</i>	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>16a</i>	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	<i>19a</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Creмоса	Elevada	Lisa

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

**Tabla 15-3** Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA.AL a temperatura 35°C

Muestra	Clon	Morfología						
		Tamaño	Forma	Color	Bodes	Consistencia	Elevación	Superficie
MB <sup>-1</sup>	1a	Pequeño	Circular	Amarillo transparente	Enteros	Mucosa	No Elevada	Lisa
	4a	Pequeño	Circular	Amarillo transparente	Enteros	Mucosa	No Elevada	Lisa
	5a	Mediano	Circular	Amarillo transparente	Enteros	Mucosa	No Elevada	Lisa
	2b	Pequeño	Circular	Melón	Irregulares	Creмоса	Elevada	Lisa
	10b	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	13b	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	14b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
	15b	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
MC <sup>-1</sup>	20b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	23b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
	25b	Pequeño	Circular	Blanco	Enteros	Creмоса	No Elevada	Lisa
	26b	Mediano	Circular	Amarillo	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	27b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	28b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	29b	Mediano	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	30b	Mediano	Circular	Blanco	Enteros	Mucosa	No Elevada	Lisa
ME <sup>-1</sup>	6a	Grande	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	7a	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Creмоса	Elevada	Lisa
	32b	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Mucosa	No Elevada	Lisa
	35b	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	No Elevada	Lisa
MF <sup>-1</sup>	12 <sup>a</sup>	Pequeño	Circular	Melón	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
	15a	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Creмоса	Elevada	Lisa

	20a	Pequeño	Circular	Amarillo	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
MF <sup>-5</sup>	33a	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	37a	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación morfológica de los 39 clones aislados a temperatura ambiente mostró el predominio del tamaño mediano con un 52%, en relación a la forma el 100% fueron circulares, en cuanto al color el que sobresale es el melón con un 44%, con relación a los bordes predomina los enteros con un 88%, la consistencia en su mayoría las cremosas con un 68%, la elevación sobresalen las elevadas con un 72% y la superficie es lisa para el 100%.

Los 25 clones aislados a 35°C mostraron el predominio del tamaño mediano con un 54%, en relación a la forma el 100% fueron circulares, en cuanto al color los clones que sobresalen son los melones con un 49%, los bordes predomina los enteros con un 77%, la consistencia en su mayoría las cremosas con un 85%, en cuanto a la elevación sobresalen las elevadas con un 92% y para terminar la superficie es lisa para el 100%.

**Tabla 16-3** Caracterización morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA suplementado con glifosato a temperatura Ambiente

Muestra	Clon	Morfología						
		Tamaño	Forma	Color	Bordes	Consistencia	Elevación	Superficie
MA <sup>-1</sup>	5b	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
MB <sup>-1</sup>	13b	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	15b	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
MC <sup>-3</sup>	5a	Mediano	Circular	Amarillo	Enteros	Cremosa	Elevadas	Lisa
	6a	Mediano	Circular	Transparente	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
MD <sup>-1</sup>	7b	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	9b	Grande	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa

	<i>11b</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>MD<sup>-3</sup></b>	<i>2a</i>	Grande	Circular	Lima	Irregulares	Mucosa	Elevada	Lisa
	<i>3a</i>	Grande	Circular	Blanco transparente	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
<b>MF<sup>-1</sup></b>	<i>1b</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

**Tabla 17-3** Identificación morfológica macroscópica, de los clones aislados del medio PCA suplementado con glifosato a 35°C

<b>Muestra</b>	<b>Clon</b>	<b>Morfología</b>						
		<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Bodes</b>	<b>Consistencia</b>	<b>Elevación</b>	<b>Superficie</b>
<b>MA<sup>-1</sup></b>	<i>8b</i>	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>MB<sup>-1</sup></b>	<i>6a</i>	Grande	Circular	Blanco transparente	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
<b>MC<sup>-1</sup></b>	<i>15a</i>	Pequeño	Circular	Rosado	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
	<i>17a</i>	Grande	Circular	Blanco transparente	Irregulares	Mucosa	Elevada	Lisa
	<i>19a</i>	Grande	Circular	Amarrillo	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	<i>20a</i>	Grande	Circular	Amarrillo	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	<i>7b</i>	Grande	Circular	Blanco transparente	Irregulares	Mucosa	Elevada	Lisa
	<i>22a</i>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>MC<sup>-3</sup></b>	<i>10a</i>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
	<i>12a</i>	Pequeño	Circular	Blanco transparente	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa
<b>MD<sup>-3</sup></b>	<i>14b</i>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>MD<sup>-5</sup></b>	<i>1a</i>	Pequeño	Circular	Blanco	Enteros	Cremosa	Elevadas	Lisa
	<i>2a</i>	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
<b>ME<sup>-1</sup></b>	<i>25b</i>	Grande	Circular	Blanco cremoso	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	<i>30a</i>	Grande	Circular	Canela	Irregular	Mucosa	Elevada	Lisa

MF <sup>-1</sup>	1b	Pequeño	Circular	Blanco transparente	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
	2b	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación morfológica de los 11 clones aislados a temperatura ambiente mostró el predominio del tamaño fueron las mediano con un 64%, la forma el 100% fueron circulares, en cuanto al color el que sobresale es el cremoso con un 64%, con relación a los bordes y consistencia predomina los irregulares y mucosas con un 73%, por otra parte, a la elevación el 100% son elevadas, y la superficie es lisa el 100%.

En los 18 clones aislados a 35°C predominó el tamaño grande con un 56%, la forma el 100% fueron circulares, en cuanto al color los que sobresalen son las blancas cremosas con un 39%, con relación a los bordes se observó los irregulares con un 61%, en relación a la consistencia el mayor número de colonias obtenidas fueron las cremosas con un 61%, la elevación el 100% son elevadas, y para terminar la superficie es lisa para el 100%.

Según el estudio realizado por Serrano, (2014) “Eficacia de los consorcios bacterianos y fúngicos nativos en la remoción de metales pesados por biolixiviación de los sedimentos de la Laguna de Colta del Cantón Colta” se encontraron 30 cepas bacterianas en la Laguna de Colta inoculadas a 37°C, y los resultados morfológicos macroscópicos mostraron su forma con el 57% irregulares, color con el 87% crema, superficie 50% planas, tamaño del 60% grandes, en este trabajo los clones aislados en su mayoría presentan una forma circular, todas son planas, bordes irregulares, de color blanco cuando son incubadas a una temperatura de 35°C, pero al incubarlas a temperatura ambiente las bacterias presentan cambios en su coloración, si bien la temperatura puede influenciar en la morfología de los clones no presentaron características muy distintas entre ellas, la superficie de las colonias era blanquecinas, con tendencia cremosa, pero además al ser estas bacterias sometidas a temperatura ambiente se evidenció viscosidad en las colonias.

3.4.1.1. *Resultados de la tinción de Gram y Evaluación de la morfológica microscópica*

**Tabla 18-3** Resultado de la Tinción Gram de los clones aislados a partir de medio PCA a temperatura ambiente y 35°C

Temperatura ambiente			Temperatura 35°C		
Clon	Cocos	Bacilos	Clon	Cocos	Bacilos
1a		Bacilos Gram +	1a		Bacilos Gram -
1b		Bacilos Gram -	1b	Cocos Gram +	
2a	Cocos Gram +		2b	Cocos Gram +	
6a		Bacilos Gram +	4b	Cocos Gram -	
7a		Bacilos Gram +	5b		Bacilos Gram +
8a		Bacilos Gram +	6b		Bacilos Gram +
9a		Bacilos Gram -	8b	Cocos Gram +	
12a		Bacilos Gram +	9b		Bacilos Gram-
13b		Bacilos Gram +	10a	Cocos Gram -	
14b		Bacilos Gram +	11b	Cocos Gram -	
15a		Bacilos Gram +	12a		Bacilos Gram-
15b		Bacilos Gram +	12b	Cocos Gram +	
16a		Bacilos Gram +	13a	Cocos Gram -	
17b		Bacilos Gram -	14a		Bacilos Gram -
18a		Bacilos Gram +	16a		Bacilos Gram -
19a		Bacilos Gram -	17b	Cocos Gram -	
20a		Bacilos Gram +	18b	Cocos Gram -	
21a		Bacilos Gram -	19a	Cocos Gram -	
22a		Bacilos Gram -	21a		Bacilos Gram +
24a		Bacilos Gram +	21b		Bacilos Gram +
31b		Bacilos Gram +	22b		Bacilos Gram -
32b		Bacilos Gram +	26 <sup>a</sup>		Bacilos Gram +
33b		Bacilos Gram -	27 <sup>a</sup>	Cocos Gram -	
39b		Bacilos Gram -	27b	Cocos Gram +	
			28b	Cocos Gram -	
			32b	Cocos Gram +	
			33b	Cocos Gram +	
<b>TOTAL</b>			<b>TOTAL</b>		
Gram+ 67%	<b>C + 4%</b>	<b>B + 63%</b>	Gram+ 44%	<b>C + 26%</b>	<b>B + 18%</b>
Gram- 33%	<b>C- 0%</b>	<b>B - 33%</b>	Gram- 56%	<b>C- 34%</b>	<b>B - 22%</b>

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación de las características microscópicas de los 24 clones crecidos en medio PCA a temperatura ambiente y 27 clones crecidos en medio PCA a 35°C mostro en todos los casos evaluados que a temperatura ambiente el mayor porcentaje siempre correspondió a la morfología bacilar con un 96% y solo el 4% cocos, mientras que a 35°C la proporción estuvo más equilibrada con un 60% bacilos y 40% cocos. Con respecto a la tinción Gram a temperatura ambiente se observó un predominio de las bacterias Gram positivos con un 67%, mientras que a 35°C el mayor porcentaje corresponde a las Gram negativas con un 56%.

Según el estudio realizado por Moreno,(2017) “Caracterización de cepas bacterianas de la Laguna Amarilla perteneciente al Nevado El Altar en la Provincia de Chimborazo” donde se trabajó con 19 clones aislados a 20°C y 37 °C, resultando que el 94.74% son bacilos Gram negativos, mientras que el 5.26% son cocos Gram positivos, en este trabajo los clones evaluados a temperatura ambiente correspondió a bacilos Gram positivos con un 63% y solo el 4% cocos Gram positivos y a 35°C la proporción estuvo más equilibrada con un 22% bacilos Gram positivos y 34% cocos Gram Negativos.

**Tabla 19-3** Resultado de la Tinción Gram de los clones aislados a partir de medio PCA.AL a temperatura ambiente y 35°C

Temperatura ambiente			Temperatura 35°C		
Clon	Cocos	Bacilos	Clon	Cocos	Bacilos
1a		Bacilos Gram -	1a		Bacilos Gram -
1b		Bacilos Gram +	2b		Bacilos Gram+
2a		Bacilos Gram -	4a		Bacilos Gram-
2b		Bacilos Gram +	5a		Bacilos Gram+
3a		Bacilos Gram +	6a		Bacilos Gram +
3b		Bacilos Gram +	7a	Cocos Gram +	
4a		Bacilos Gram -	10b		Bacilos Gram -
4b		Bacilos Gram +	12a		Bacilos Gram -
5b		Bacilos Gram -	13b		Bacilos Gram -
6a		Bacilos Gram +	14b		Bacilos Gram -
6b		Bacilos Gram +	15a	Cocos Gram +	
7a		Bacilos Gram +	15b		Bacilos Gram +
8a		Bacilos Gram -	20a		Bacilos Gram +
8b		Bacilos Gram -	20b	Cocos Gram +	
9a		Bacilos Gram +	23b		Bacilos Gram +
9b		Bacilos Gram +	25b	Cocos Gram +	
10a		Bacilos Gram +	26b		Bacilos Gram +
10b		Bacilos Gram +	27b	Cocos Gram +	
11a		Bacilos Gram +	28b	Cocos Gram +	

12b		Bacilos Gram -	29b		Bacilos Gram-
13a	Cocos Gram -		30b		Bacilos Gram +
13b		Bacilos Gram +	32b		Bacilos Gram -
14a	Cocos Gram +		33a		Bacilos Gram +
14b		Bacilos Gram +	35b		Bacilos Gram +
15a		Bacilos Gram -	37a		Bacilos Gram -
15b		Bacilos Gram -			
16a		Bacilos Gram -			
16b		Bacilos Gram -			
17b		Bacilos Gram +			
18b		Bacilos Gram +			
19a		Bacilos Gram +			
19b		Bacilos Gram -			
20b		Bacilos Gram -			
21a		Bacilos Gram +			
21b		Bacilos Gram -			
22b		Bacilos Gram -			
24b		Bacilos Gram +			
25b		Bacilos Gram +			
<b>TOTAL</b>			<b>TOTAL</b>		
Gram+ 50%	C + 1%	B + 49%	Gram+ 50%	C + 31%	B + 19%
Gram- 50%	C- 0%	B - 50%	Gram- 50%	C- 0%	B - 50%

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación de las características microscópicas y de tinción Gram en los 38 clones crecidos en medio PCA.AL a temperatura ambiente y 25 clones crecidos en medio PCA.AL a 35°C mostro en todos los casos evaluados que a temperatura ambiente el mayor porcentaje siempre correspondió a la morfología bacilar el 99% y solo el 1% cocos, mientras que a 35°C con un 69% bacilos y 31% cocos. Con respecto a la tinción Gram a temperatura ambiente y 35°C se observó una igualdad de las bacterias Gram positivos con un 50%, y Gram negativas con un 50%.

**Tabla 20-3** Resultado de la Tinción Gram de los clones aislados a partir de medio PCA suplementada con glifosato temperatura ambiente y a 35°C

Temperatura ambiente			Temperatura 35°C		
Clon	Cocos	Bacilos	Clon	Cocos	Bacilos
2a		Bacilos Gram +	1a	Cocos Gram +	
1b		Bacilos Gram -	1b		Bacilos Gram+
3a		Bacilos Gram +	2a		Bacilos Gram+
5a		Bacilos Gram -	2b		Bacilos Gram -

<b>5b</b>		Bacilos Gram -	<b>6a</b>		Bacilos Gram+
<b>6a</b>		Bacilos Gram -	<b>7b</b>		Bacilos Gram+
<b>9b</b>	Cocos Gram +		<b>8b</b>		Bacilos Gram -
<b>11b</b>		Bacilos Gram -	<b>10a</b>		Bacilos Gram -
<b>13b</b>		Bacilos Gram +	<b>12a</b>	Cocos Gram +	
<b>15b</b>		Bacilos Gram +	<b>14b</b>		Bacilos Gram -
			<b>15a</b>	Cocos Gram +	
			<b>17a</b>		Bacilos Gram -
			<b>19a</b>		Bacilos Gram -
			<b>20a</b>		Bacilos Gram -
			<b>22a</b>	Cocos Gram +	
			<b>25a</b>	Cocos Gram +	
			<b>25b</b>		Bacilos Gram -
			<b>30a</b>		Bacilos Gram -
<b>TOTAL</b>			<b>TOTAL</b>		
Gram+ 58%	<b>C + 3%</b>	<b>B + 55%</b>	Gram+ 64%	<b>C + 24%</b>	<b>B + 40%</b>
Gram- 42%	<b>C- 0%</b>	<b>B - 42%</b>	Gram- 36%	<b>C- 0%</b>	<b>B - 36%</b>

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación de las características microscópicas y de tinción Gram de los 10 clones crecidos en medio PCA suplementados con glifosato (0,5mL/100mL) a temperatura ambiente y 18 clones crecidos en medio PCA suplementados con glifosato (0,5mL/100mL) a 35°C mostro en todos los casos evaluados que a temperatura ambiente el mayor porcentaje siempre correspondió a la morfología bacilar con un 97% y solo el 3% cocos, mientras que a 35°C el mayor porcentaje con un 76% corresponde a bacilos y 24% a cocos. Con respecto a la tinción Gram a temperatura ambiente y a 35°C se observó un predominio de las bacterias Gram positivos con un 58% y 42% respectivamente.

Con respecto a las características de tinción de Gram se observó que entre las tres condiciones estudiadas el PCA suplementado con glifosato presento un comportamiento variable obteniendo un mayor porcentaje de Gram negativas a diferencia del medio PCA y PCA.AL que presentaron un mayor porcentaje de Gram positivas.

En el estudio realizado por Cazorla, (2013) “Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la Laguna San Antonio del Cantón Riobamba”, en la primera etapa se obtuvieron un total de 17 cepas puras aisladas a 18°C, la mayoría son bacilos grades y pequeños, en este trabajo se obtuvieron en su mayoría bacilos Gram positivos ( 63%) en el medio PCA, (49%) en medio PCA.AL y (55%) en medio PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente.

### 3.5. Microorganismos Tolerantes

#### 3.5.1. Tolerancia a glifosato de los clones aislados

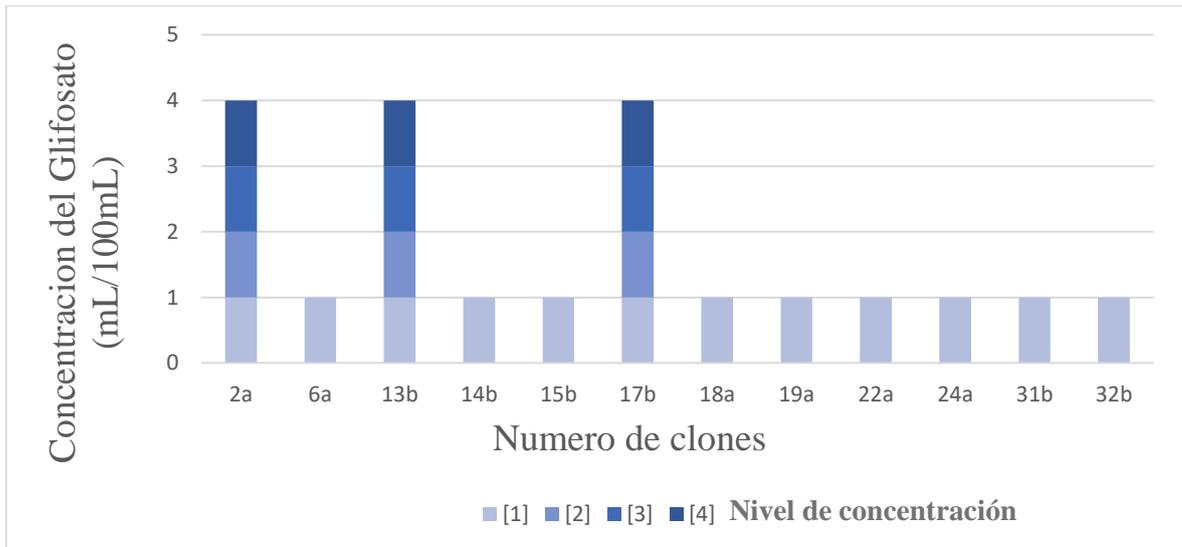
**Tabla 21-3** Resultado del crecimiento de los clones aislados en PCA a temperatura ambiente y 35°C en medio PCA suplementado con Glifosato a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4 y 5 mL/100mL)

Temperatura ambiente						Temperatura 35°C				
Clon	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	Clon	[1]	[2]	[3]	[4]
2a	1	1	1	1	0	1a	1	1	1	0
6a	1	0	-	-	-	1b	1	0	-	-
13b	1	1	1	1	0	2b	1	0	-	-
14b	1	0	-	-	-	4b	1	0	-	-
15b	1	0	-	-	-	5b	1	0	-	-
17b	1	1	1	1	0	6b	1	1	0	-
18a	1	0	-	-	-	8b	1	0	-	-
19a	1	0	-	-	-	9b	1	0	-	-
22a	1	0	-	-	-	11b	1	0	-	-
24a	1	0	-	-	-	12b	1	1	0	-
31b	1	0	-	-	-	17b	1	0	-	-
32b	1	0	-	-	-	18b	1	0	-	-
						19a	1	0	-	-
						21a	1	1	1	0
						21b	1	1	1	0
						27b	1	0	-	-
						28b	1	1	1	0
						33b	1	1	1	0

1 = crecimiento, - = no se sembró, 0 = no crecimiento

[1], [2], [3], [4], [5] Concentración mL/100mL

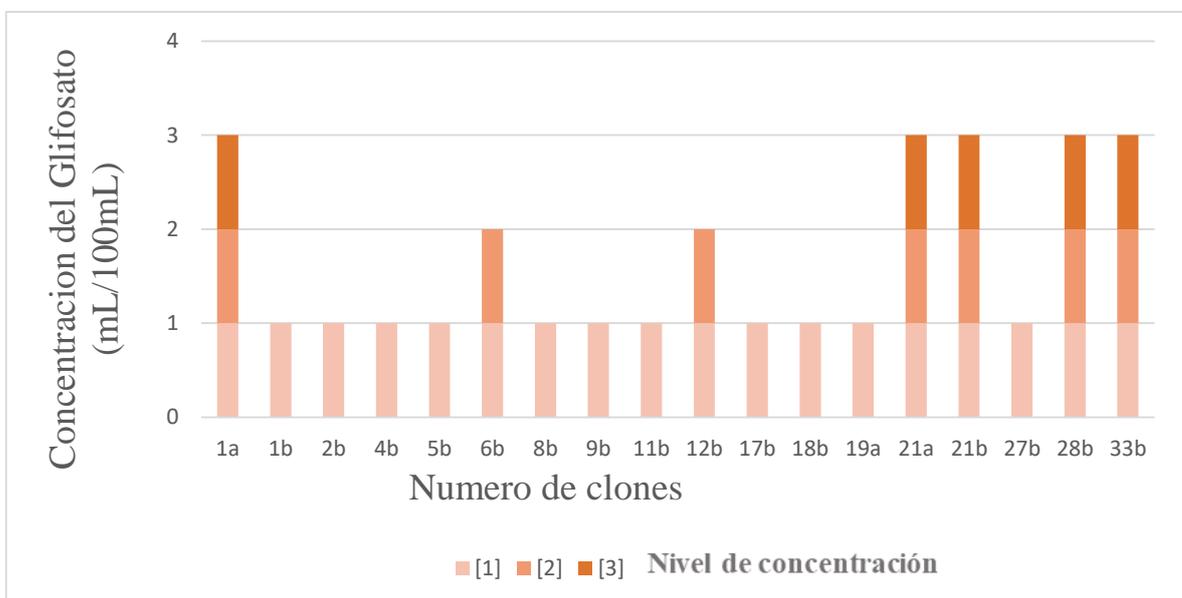
Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019



**Gráfico 3-3** Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA a temperatura ambiente.

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

Las pruebas de evaluación de la tolerancia a glifosato de los 12 clones aislados en medio PCA a temperatura ambiente mostraron que el 25% de los clones (2a, 13b, 17b) fueron los que presentaron mayor tolerancia mostrando crecimiento hasta una concentración de (4 mL/100mL) del tóxico como se muestra en la figura (1-3)



**Gráfico 4-3.** Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA a 35°C.

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

Las pruebas de evaluación de la tolerancia a glifosato de los 18 clones aislados en medio PCA a 35°C mostraron que el 28% de los clones (1a, 21a, 21b, 28b, 33b), crecieron hasta una concentración de (3 ml/100mL) del toxico (figura 2-3). Es importante hacer notar que la tolerancia máxima obtenida a 35°C (3mL/100mL) es menor a la encontrada a temperatura ambiente (5mL/100mL).

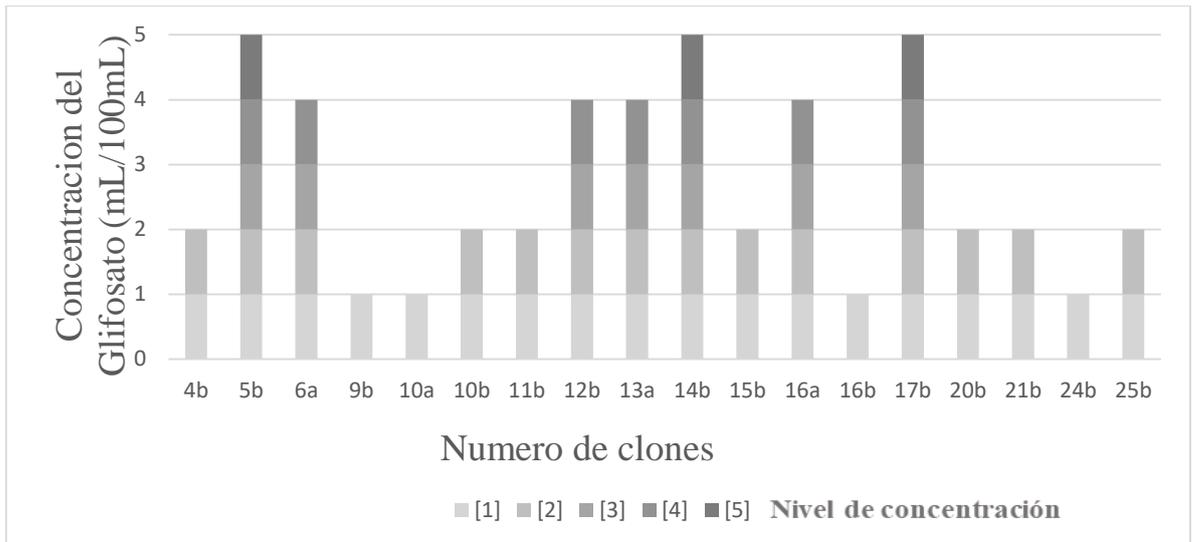
**Tabla 22-3** Resultado del crecimiento de los clones aislados en PCA.AL a temperatura ambiente y 35°C en medio PCA suplementado con glifosato a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4 y 5 mL/100mL)

Temperatura Ambiente						Temperatura 35°C				
Clon	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	Clon	[1]	[2]	[3]	[4]
4b	1	1	0	-	-	2b	1	1	1	0
5b	1	1	1	1	1	5a	1	1	0	-
6a	1	1	1	1	0	6a	1	0	-	-
9b	1	0	-	-	-	7a	1	0	-	-
10a	1	0	-	-	-	10b	1	0	-	-
10b	1	1	0	-	-	12a	1	1	0	-
11b	1	1	0	-	-	13b	1	1	0	-
12b	1	1	1	1	0	14b	1	1	0	-
13a	1	1	1	1	0	15a	1	1	0	-
14b	1	1	1	1	1	15b	1	1	1	0
15b	1	1	0	-	-	20a	1	0	-	-
16a	1	1	1	1	0	23b	1	0	-	-
16b	1	0	-	-	-	25b	1	1	0	-
17b	1	1	1	1	1	26b	1	1	0	-
20b	1	1	0	-	-	28b	1	1	1	0
21b	1	1	0	-	-	29b	1	1	0	-
24b	1	0	-	-	-	30b	1	1	0	-
25b	1	1	0	-	-	32b	1	1	0	-
						33a	1	1	1	0
						35b	1	0	-	-
						37a	1	1	1	0

1 = crecimiento, - = no se sembró, 0 = no crecimiento

[1], [2], [3], [4], [5] Concentración mL/100mL

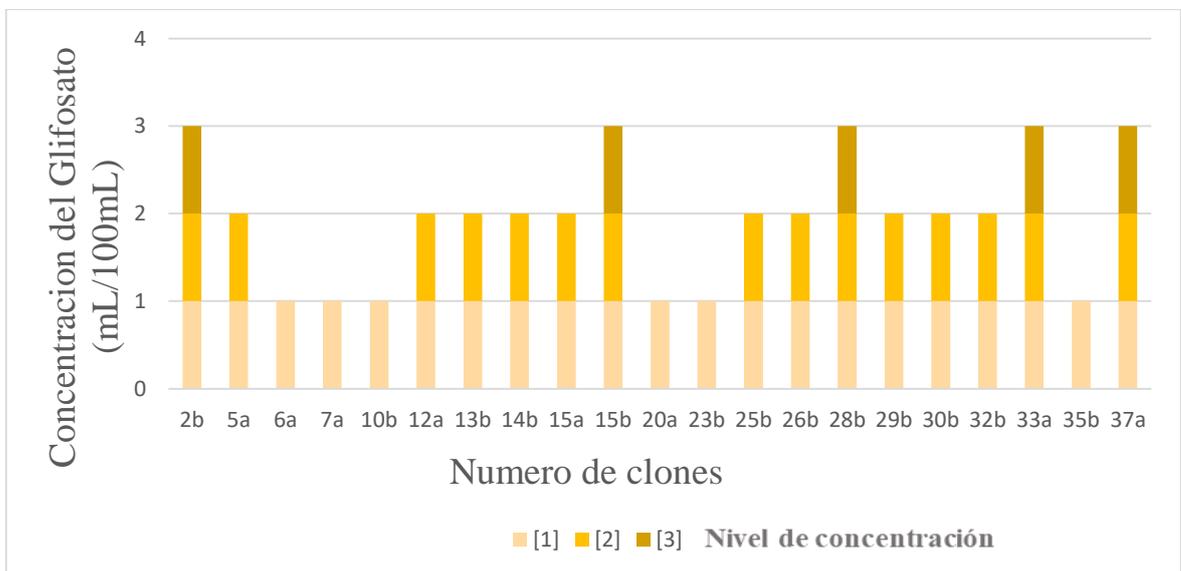
Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019



**Gráfico 5-3.** Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA.AL a temperatura ambiente.

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación de la tolerancia a glifosato de los 18 clones aislados en medio PCA.AL a temperatura ambiente mostro que los clones 5b, 14b, 17b (17%) presentaron un crecimiento hasta una concentración de 5 ml/100mL del toxico.



**Gráfico 6-3.** Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA.AL a 35°C.

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación de la tolerancia a glifosato de los 21 clones aislados en medio PCA AL a temperatura 35°C mostró que el 24% de los clones (2b, 15b, 28b, 33a, 37a), presentan crecimiento hasta una concentración de (3 ml/100mL) del toxico como se muestra en la figura (4-3)

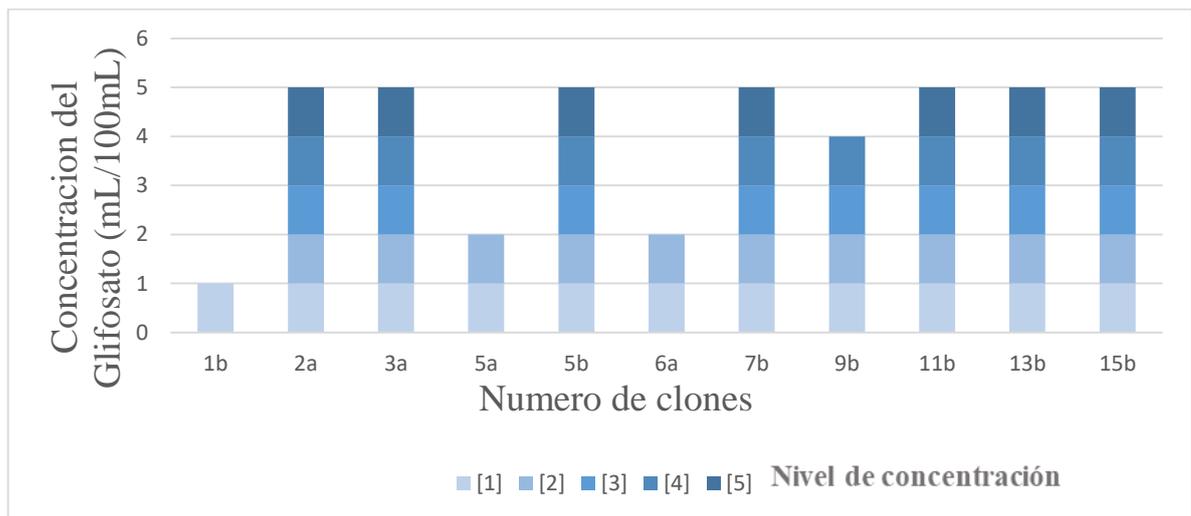
**Tabla 23-3** Resultado del crecimiento de los clones aislados en PCA suplementado con Glifosato a temperatura ambiente y 35°C en medio PCA suplementado con Glifosato a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4,5 mL/100mL)

Temperatura 35°C						Temperatura 35°C					
Clones	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	Clones	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
1b	1	0	-	-	-	1a	1	1	1	1	1
2a	1	1	1	1	1	1b	1	1	1	0	-
3a	1	1	1	1	1	2a	1	1	1	1	1
5a	1	1	0	-	-	2b	1	1	1	1	1
5b	1	1	1	1	1	6a	1	0	-	-	-
7b	1	1	1	1	1	7b	1	1	1	1	1
6a	1	1	0	-	-	8b	1	1	0	-	-
9b	1	1	1	1	0	10a	1	0	-	-	-
11b	1	1	1	1	1	14b	1	1	0	-	-
13b	1	1	1	1	1	15a	1	0	-	-	-
15b	1	1	1	1	1	19a	1	0	-	-	-
						20a	1	1	0	-	-
						22a	1	0	-	-	-
						25a	1	0	-	-	-
						25b	1	1	1	1	1
						30a	1	1	0	-	-

1 = crecimiento, - = no se sembró, 0 = no crecimiento

[1], [2], [3], [4], [5] Concentración mL/100mL

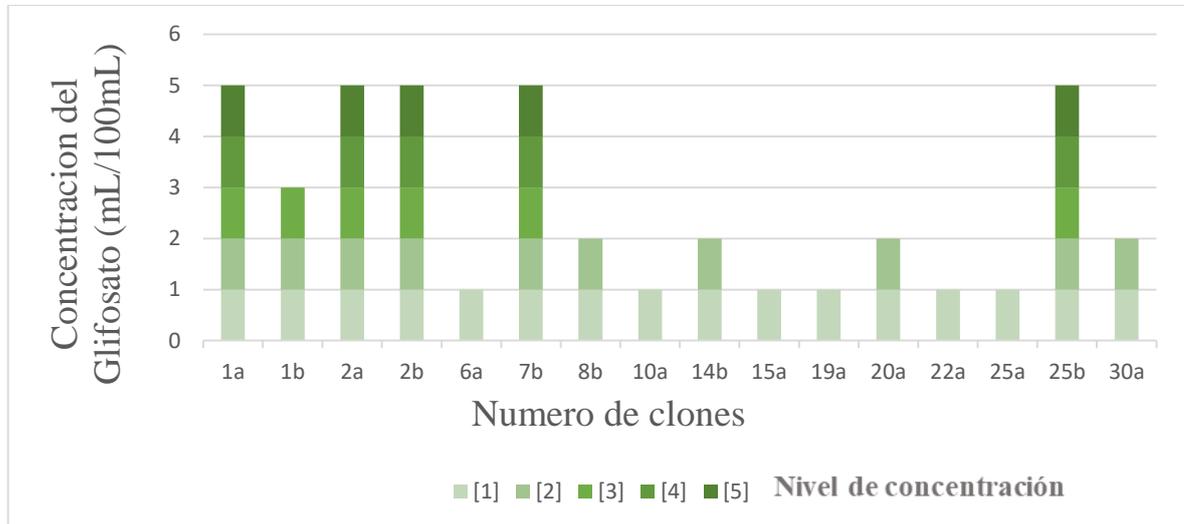
Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019



**Gráfico 7-3.** Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente.

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

Las pruebas de evaluación de la tolerancia a glifosato de los 11 clones aislados en medio PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente mostraron que el 64% de los clones (2a, 3a, 5b, 7b, 11b, 15b) presentaron mayor tolerancia mostrando crecimiento hasta una concentración de 5 ml/100mL del toxico como se muestra en la figura (5-3).



**Gráfico 8-3.** Efecto del Glifosato a diferentes concentraciones (mL/100mL) sobre el crecimiento de clones bacterianos del medio PCA suplementado con glifosato a 35°C.

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

Las pruebas de evaluación de la tolerancia a glifosato de los 16 clones aislados en medio PCA suplementado con glifosato a 35°C mostró que el 31% de los clones (1a, 2a, 2b, 7b, 25b) fueron capaces de crecer hasta la concentración de 5 ml/100mL como se muestra en la figura (6-3) lo que indica que los clones que mostraron mayor tolerancia al toxico se obtienen de la temperatura ambiente, de decir; la temperatura de la laguna.

La evaluación de la tolerancia de los clones aislados a partir de PCA, PCA.AL y PCA suplementado con glifosato, mostró un comportamiento variable, todos los clones aislados fueron capaces de crecer en presencia de glifosato en la concentración más baja empleada (1 ml/100mL), observándose la mayor tolerancia (5 ml/100mL) en un 64% de los clones que fueron aislados utilizando al glifosato como suplemento a temperatura ambiente (2a, 3a, 5b, 7b, 11b,13, 15b), así mismo a 35°C alcanzaron una tolerancia de (5 ml/100mL) el 31% de los clones suplementados con glifosato (1a, 2a, 2b, 7b, 25b).

En un estudio realizado por Méndez ( 2015) “Aislamiento e identificación de bacterias capaces de degradar glifosato”, se obtuvo un nivel máximo de tolerancia de (1 y 6 g/L) del toxico, en este trabajo se obtuvieron clones bacterianos con un nivel de tolerancia 10 veces mayor (5 ml/100mL).

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la tolerancia al glifosato se observó que esta se ve favorecida en los clones cultivados a temperatura ambiente. Según un estudio realizado por Martínez *et al.*, (2013) “Tolerancia y Degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de Roundup SL®” en Colombia, se observaron bacterias cuya temperatura optima de crecimiento fueron 17°C al igual que en nuestro caso.

### 3.5.2. Tolerancia a Paraquat de los clones aislados y estabilizados

Para conocer el comportamiento de los clones más tolerantes al glifosato se procedió a realizar una evaluación de la tolerancia ante el paraquat.

Luego de haber analizado la evaluación al glifosato se realizó la tolerancia al paraquat con los clones que sobrevivieron la concentración de 5ml/100ml de glifosato.

**Tabla 24-3** Resultado del crecimiento de los clones más tolerantes a glifosato aislados a temperatura ambiente y 35°C en presencia de paraquat en tres concentraciones (1, 2, 3 mL/100mL) luego de 72 horas de cultivo en medio PCA, PCA.AL, PCA suplementado con glifosato.

Temperatura ambiente				Temperatura 35°C			
<b>PCA</b>							
Clones	[1]	[2]	[3]	Clones	[1]	[2]	[3]
2a	1	0	-	1a	1	0	-
3a	1	0	-	28b	1	1	1
5b	1	1	1	33b	1	1	1
6a	1	0	-				
6b	1	1	1				
7b	1	0	-				
9b	1	0	-				
11b	1	0	-				
13b	1	0	-				
15b	1	0	-				
<b>PCA.AL</b>							
Clon	[1]	[2]	[3]	Clon	[1]	[2]	[3]
4b	1	1	0	2b	1	1	0

<b>5b</b>	1	1	1	<b>5a</b>	1	0	-
<b>17b</b>	1	1	0	<b>14b</b>	1	1	0
				<b>26b</b>	1	0	-
				<b>33a</b>	1	0	-
				<b>37a</b>	1	0	-
<b>PCA suplementado con glifosato</b>							
<b>Clon</b>	<b>[1]</b>	<b>[2]</b>	<b>[3]</b>	<b>Clon</b>	<b>[1]</b>	<b>[2]</b>	<b>[3]</b>
<b>2a</b>	1	0	-	<b>2a</b>	1	1	1
<b>6a</b>	1	0	-	<b>2b</b>	1	1	1
<b>13b</b>	1	0	-	<b>7b</b>	1	1	1
<b>14b</b>	1	0	-	<b>8b</b>	1	0	-
<b>15a</b>	1	0	-	<b>25b</b>	1	1	1
<b>15b</b>	1	0	-				
<b>16a</b>	1	0	-				
<b>17b</b>	1	0	-				
<b>19b</b>	1	0	-				
<b>31b</b>	1	0	-				
<b>32b</b>	1	0	-				
<b>33b</b>	1	0	-				
<b>39b</b>	1	0	-				

1 = crecimiento, - = no se sembró, 0 = no crecimiento

[1], [2], [3] Concentración mL/100mL

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

Según Della, A (2004, p.17, 22) la tolerancia del paraquat es de 2ml/100ml y en las pruebas de tolerancia a paraquat de los clones del medio PCA a temperatura ambiente, se observó una alta tolerancia al paraquat, mostrando un crecimiento en todos los casos a concentración de 1 ml/100mL, y solamente los clones 5b y 6b fueron capaces de crecer a la concentración de 2 y 3 ml/100mL.

Las pruebas de tolerancia a paraquat de los clones aislados en medios PCA a temperatura 35°C mostraron similar tolerancia al paraquat, observándose un crecimiento en todos los clones expuestos a una concentración de 1 ml/100mL de paraquat, y solamente los clones 28b, 33b, mostraron un crecimiento hasta una concentración de 2 y 3 ml/100mL.

En las pruebas de tolerancia a paraquat de los clones del medio PCA.AL a temperatura ambiente, al igual que en los casos anteriores se observó tolerancia al paraquat, con un crecimiento en todos

sus casos a concentración de 1 ml/100mL, y solamente el clon 5b fue capaz de crecer a la concentración de 2 y 3 ml/100mL.

En las pruebas de tolerancia a paraquat de los clones del medio PCA.AL a 35°C, se observó una baja tolerancia al paraquat, mostrando un crecimiento en todos sus casos a concentración de 1 ml/100mL, y solamente los clones 2b y 14b fueron capaces de crecer a la concentración de 2 ml/100mL.

En las pruebas de tolerancia a paraquat de los clones aislados en medio PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente, se evidencio una baja tolerancia al paraquat, observándose crecimiento en todos los casos a una concentración hasta de 1 ml/100mL, mientras que en las pruebas de tolerancia de los clones de 35°C, se observó una mayor tolerancia al paraquat, observándose un crecimiento en todos los casos a concentración de 1 ml/100mL, y en cuatro clones (2a, 2b, 7b, 25b) se observó un crecimiento hasta una concentración de 3 ml/100mL.

Las pruebas de tolerancia a glifosato mostraron crecimiento hasta una concentración de 5 mL/100mL, mientras que para el paraquat se obtuvo crecimiento hasta la concentración de 3 mL/100mL. En el medio con PCA a temperatura de 35°C los clones 28b y 33b crecieron hasta una concentración de 3 mL/100mL en paraquat. En el medio con PCA.AL el clon 17b soporto una concentración de 2 mL/100mL en el paraquat y 5 mL/100mL en el glifosato.

Observándose que el mayor número de clones capaces de crecer a 3mL/100mL de paraquat fueron los provenientes de 35°C (6 de 14) con un 42%, en comparación con los provenientes de la temperatura ambiente donde solo un 12,5% (3 de 26) fueron capaces de crecer a la misma concentración

En un estudio realizado por Chan *et al.*, (2014) para evaluar la toxicidad del paraquat se realizaron pruebas de tolerancia al paraquat a 25 °C a partir de concentraciones (93 mg/L), (187 mg/L), (375 mg/L) y (750 mg/L). A partir del tratamiento con 187 mg/L no se observó crecieron. En la dosis más alta nueve de los 13 clones tuvieron 100 % de inhibición.

La evaluación de la tolerancia al paraquat mostro a diferencia de lo obtenido para el glifosato que la selección con esta sustancia no le otorgo ninguna ventaja de crecimiento a estos clones a temperatura ambiente, sin embargo, a diferencia de lo encontrado con glifosato, los clones evaluados a 35°C mostraron mayor tolerancia al paraquat que los aislados a temperatura ambiente.

### **3.6. Resistencia a antibióticos**

**Tabla 25-3** Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina (S10), Oxacillin (OX1), Neomicina (NN) sobre los clones aislados del PCA tolerantes a (4mL/100mL) de glifosato a temperatura ambiente y (3mL/100mL) de paraquat a 35°C

Pesticida	Clones	S10	OX1	NN
Glifosato	17a	18mm	ND	13mm
Paraquat	33b	18 mm	8mm	ND
	28b	21mm	ND	ND

ND= No definido

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación del efecto de los antibióticos sobre tres clones aislados en PCA a 35°C, mostro sensibilidad ante los antibióticos S10, NN demostrando un nivel bajo de resistencia al OX1.

**Tabla 26-3** Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina (S10), Oxacillin (OX1), Methicillin (ME5), Ceftazidime (CAZ30) sobre los clones aislados del PCA.AL tolerante (4mL/100mL) de glifosato y a (3mL/100mL) de paraquat temperatura ambiente.

Pesticida	Clones	S10	OX1	ME5	CAZ30
Glifosato	5b	18mm	R	R	ND
	5a	ND	R	R	ND
	12b	27mm	R	ND	ND
	13a	ND	ND	11mm	8mm
	14b	10mm	9mm	ND	R
	16a	ND	R	ND	12mm
	17b	10mm	R	10mm	ND
Paraquat	5b	ND	ND	R	9mm

ND= no definido

R= Resistente

**Realizado por:** Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación de la resistencia a los cinco antibióticos S10, OX1 , ME5 y CAZ30, en los clones seleccionados utilizando glifosato mostro un comportamiento diferente; el mayor nivel de resistencia fue observado para Oxacillin OX1 con cinco clones resistentes, seguido de ME5 con tres clones.

**Tabla 27-3** Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina (S10), Oxacillin (OX1), Neomicina (NN), Methicillin (ME5), Kanamycin (K30), Ceftazidime (CAZ30) sobre los clones aislados del PCA suplementados con glifosato tolerante (5mL/100mL) del toxico y a (3mL/100mL) de paraquat temperatura ambiente.

Pesticida	Clon	S10	OX1	NN	ME5	K30	CAZ30
Glifosato	2a	ND	R	ND	ND	ND	R
	3a	ND	R	ND	ND	ND	R
	7b	27mm	R	ND	ND	ND	ND
	11b	ND	ND	ND	9mm	ND	9mm
	13b	ND	9mm	ND	ND	ND	9mm
	15b	ND	R	ND	ND	ND	9mm
Paraquat	5a	ND	ND	ND	9mm	ND	9mm
	6a	12mm	ND	ND	ND	R	ND
	11b	ND	ND	13mm	R	ND	ND

ND= no definido

R= Resistente

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación de la resistencia a los seis antibióticos S10 y NN, ME5, CAZ30, OX1, K30 en los clones seleccionados utilizando glifosato mostro un comportamiento variado; el mayor nivel de resistencia fue observado para Oxacillin OX1 con cuatro clones resistentes, seguido de CAZ30 con dos clones.

**Tabla 28-3** Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina (S10), Oxacillin (OX1), Neomicina (NN), Methicillin (ME5), Cefazolin (CZ30), Ceftazidime (CAZ30) sobre los clones aislados del PCA suplementado glifosato tolerantes a (5mL/100mL) del toxico y a (3mL/100mL) de paraquat a temperatura 35°C

Pesticida	Clon	S10	OX1	NN	ME5	CZ30	CAZ30
Glifosato	1b	R	R	ND	ND	ND	ND
	2a	22mm	R	ND	ND	ND	ND
	2b	ND	ND	14mm	ND	R	ND
	7b	ND	R	ND	ND	ND	R
	25b	ND	ND	ND	R	ND	R
Paraquat	2a	ND	ND	ND	ND	R	8mm
	2b	ND	ND	ND	R	ND	R

ND= No definido

R= Resistente

Realizado por: Macas, Catherine; Tipatansig, Katherine, 2019

La evaluación del efecto de los seis antibióticos sobre 7 clones aislados del medio PCA suplementado con glifosato y tolerantes a paraquat a temperatura 35°C, mostró que hay un alto nivel de resistencia a los antibióticos OX1, ME5, CZ30 y CAZ30 y sensibilidad a la S10, NN, observándose que existe una mayor resistencia que sensibilidad.

Es de hacer notar que de los clones evaluados el 63% mostro sensibilidad al menos a uno de los antibióticos evaluados.

## CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos de las encuestas demostraron que el pesticida más utilizado para controlar las malezas en los cultivos aledaños a la laguna de Colta es aquel que tiene como principio activo el glifosato.
- El crecimiento mostrado por las bacterias presentes en las muestras de agua al ser cultivadas en medios PCA preparado con agua destilada, medio PCA preparado con agua de la laguna y medio PCA suplementado con glifosato, permite concluir que el medio PCA suplementado con glifosato fue el medio que presentó menor crecimiento de los clones debido a que el glifosato es una sustancia tóxica.
- Con respecto al recuento de las bacterias se encontró mayor número de UFC a temperatura ambiente que a 35°C, suponemos que esto se debe a que la microbiota presente en las muestras de agua posee una temperatura óptima de crecimiento cercana a la de la laguna (16°C).
- En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron los clones bacterianos presentes en el agua de la Laguna de Colta utilizando tres medios (PCA preparado con agua destilada, PCA preparado con agua de la laguna, PCA suplementado con glifosato). El mayor nivel de tolerancia con un crecimiento del 64% de los clones fue obtenido para los clones aislados en el medio PCA suplementado con glifosato, los cuales a temperatura ambiente mostraron tolerancia hasta 5 mL/100mL, similar nivel de tolerancia fue obtenido a 35°C pero solo en un 3% de los clones. Estos resultados nos permiten concluir que la mayor tolerancia está relacionada con la temperatura ambiente y parecerá indicar que estamos en presencia de bacterias en las cuales las condiciones metabólicas óptimas para tolerar el tóxico están a bajas temperaturas.

## RECOMENDACIONES

- Al momento de realizar la toma de las muestras procurar no afectar el lugar para no obtener muestras alteradas y que no sean representativas para su posterior utilización.
- Realizar estudios microbiológicos en diferentes épocas del año para verificar si la microbiota de la Laguna de Colta puede variar con el cambio de estaciones.
- Realizar una evaluación más detallada de los distintos clones aislados en esta investigación, con el fin de determinar la capacidad de degradar tanto al glifosato como al paraquat, de tal manera que puedan ser utilizados en procesos de biorremediación.
- Realizar pruebas bioquímicas o de biología molecular para determinar las especies a las que corresponden los clones bacterianos más importantes en la presente investigación.
- Desarrollar mecanismos de estudio sobre microbiología ambiental donde se evalué los microorganismos con capacidad de adaptarse y resistir a condiciones extremas, con el fin de propagar el estudio e investigación en el ámbito biotecnológico y fomentar su aplicación de manera ambientalmente sostenible.

## BIBLIOGRAFICA

1. **100CIA.SITE** ¿Qué es la tinción de Gram y cómo hacerla? - 100CIA. [En línea] 2018. [Consulta: 08 de junio 2018] Disponible en: <http://100cia.site/index.php/quimica/item/3062-que-es-la-tincion-de-gram-y-como-hacerla>.
2. **Agua.org.mx** ¿Qué es el agua?. [En línea] 2010. [Consulta: 18 de Febrero del 2019] Disponible en: <https://agua.org.mx/que-es/>
3. **Agua.org.mx** . Agua en el planeta. [En línea] 2011. [Consulta: 15 de abril del 2019] Disponible en: <https://agua.org.mx/en-el-planeta/>
4. **ACEVEDA, Rosa., SEVERICHE, Carlos. & JAIMES, Jose.** "Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos". *Producción mas limpia*, [En línea] 2016 ( Ecuador),pp. 161-173 [Consulta: 08 de junio 2018] Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/viewFile/906/629>
5. **Andrade, M. and Orbe, X.** "La contaminación del sector de Yahuarcocha, por las actividades antropogénicas de sus habitantes". [En línea] 2010 (Trabajo de Titulacion) (Pergrado) Uniersidad Tecnica del Norte, Ibarra, Ecuador. pp. 29-45. [Consulta: 19 de Febrero del 2019]. Disponible en: [http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2200/1/05\\_FECYT\\_979.pdf](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2200/1/05_FECYT_979.pdf)
6. **ÁNGEL, Stephanie.** "Identificación y clasificación de bacterias capaces de degradar Glifosato", [En línea] 2014 ( Tesis)(Proyecto dde gado) Universidad ICESI, Cali Colombia,pp.1-53. [Consulta: 17 de junio 2018]. Disponible en: [https://repository.icesi.edu.co/biblioteca\\_digital/bitstream/10906/78085/1/angel\\_identificacion\\_clasificacion\\_2014.pdf](https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/78085/1/angel_identificacion_clasificacion_2014.pdf)
7. **BERRIOS, Alberto. & BERTHOULY, Marc.** *Tecnología del cultivo de tijdos de cafe (coffea arabica)*. 1ra ed, Bib. Orton IICA / CATIE, 1987, pp. 2,3
8. **BROOKS, G. F. y otros.** *Microbiología médica*. 26e edn. Edited by 2014 AMGH Editora.1954,pp1.

9. **CAMACHO, A. y otros.** "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico", [En línea] 2009 (*Practica de laboratorio*) Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 1–8. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones\\_6526.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf).
10. **CAZORLA, E.** "Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna San Antonio del cantón Riobamba" [En línea] 2014 ( Tesis)(Proyecto de grado) Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Riobamba Ecuador , pp.1-147. [Consulta: 30 de abril 2019]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/3498/1/236T0102%20UDCTFC.pdf>
11. **CHAN, W. y otros.** (2014) "Toxicidad In Vitro De Los Herbicidas Atrazina y Paraquat Sobre El Crecimiento Vegetativo y La Esporulación de Hongos Saprobios Del Suelo", *Scielo* [En línea] 2014 ( Ecuador), pp. 393–406 [Consulta: 12 de febrero 2018] Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992014000400007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992014000400007)
12. **CIFUENTES, P.** "Diseño de un Corredor Turístico de la Laguna De Colta Provincia de Chimborazo, Mediante Actividades de Ciclo Paseo para Incrementar el Flujo Turístico", [En línea] 2017( Tesis), ( Trabajo de grado) Universidad Nacional de Chimborazo,Chimborazo, Ecuador .pp 1-203. [Consulta: 22 de enero 2018] Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/3743>
13. **CIVEIRA, G.** "Recopilación sobre los efectos del Glifosato en agroecosistemas", *Asociación Argentina Ciencia del Suelos, INTA Castelar.* [En línea] 2012 ( Argentina),pp. 1-9 [Consulta: 10 de junio 2018] Disponible en: [http://www.suelos.org.ar/adjuntos/glifosato\\_en\\_agroecosistemas.pdf](http://www.suelos.org.ar/adjuntos/glifosato_en_agroecosistemas.pdf).
14. **CORTINA, C. y otros.** "Efectos de la intoxicación por glifosato en la población agrícola ".*CES, Salud Publica* [En línea] 2017 ( Colombia Medellin),pp. 1 [Consulta: 17 de diciembre 2018] Disponible en: [http://revistas.ces.edu.co/index.php/ces\\_salud\\_publica/article/viewFile/4427/2824](http://revistas.ces.edu.co/index.php/ces_salud_publica/article/viewFile/4427/2824)
15. **DELLA, A.** "Impacto del herbicida paraquat sobre invertebrados acuáticos". [En línea] 2004. (Tesis), (Posgrado). Universidad de Buenos Aires. pp. 17-22 [Consulta: 24 de Febrero del 2019]. Disponible en: [https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3764\\_DellaPenna.pdf](https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n3764_DellaPenna.pdf)

16. **DELILLE, D. & CAHET, G.** "Determinacion de los factores para la estimacion de la produccion bacteriana marina subantartica medida por la metodologia de incorporacion de 3H- timidina", *Aquatic Microbial Ecology*, 13 [En línea] 1997, pp. 121–125. [Consulta: 20 de diciembre 2018] Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/1359/d24999f0cd93adf3a68ebcfbaf9c1e4521ce.pdf>
17. **ECOLOGIA Y MEDIO AMBIENTE EN GENERAL.** "Que es Contaminación Industrial Causas Consecuencias, efectos, características". [En línea] 2012. [Consulta: 19 de Febrero del 2019]. Disponible en: <https://emagen.com.mx/contaminacion/contaminacion-industrial/>
18. **EMAGEN.** " Contaminación Industrial Del Agua". [En línea] 2015. [Consulta: 16 de Abril del 2019]. Disponible en: <https://emagen.com.mx/contaminacion/industrial-del-agua/>
19. **FLORES, A. and RÍOS, K.** "Las lagunas de la alta montaña", [En línea] 2010. (Ecuador), [Consulta: 19 de Febrero del 2019]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcg/article/view/70831>.
20. **FUENTES, J. F. y otros .** "Inventario y caracterización morfológica de lagos y lagunas de alta montaña en las Provincias de Palencia y León", *Pirineos*, 170(0), (España)', [En línea] 2015, p. e013. [Consulta: 14 de diciembre 2018] Disponible en: [10.3989/Pirineos.2015.170006](https://doi.org/10.3989/Pirineos.2015.170006).
21. **GARIBALDI, P., SANTAMBROSIO, E. y ORTEGA, M.** "Siembra y recuento de microorganismos", Universidad Tecnológica Nacional, [En línea] 2009 pp. 1–8. [Consulta: 20 de diciembre 2018] Disponible en: [https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practicoII.pdf](https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoII.pdf).
22. **GARCIA, M. et al.** "Cólera y otras infecciones del género Vibrio". [En línea] 2010. (España). [Consulta: 20 de Abril del 2019]. Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Colera\\_actualizaci%C3%B3n\\_Medicina2010.pdf?fbclid=IwAR1mrZwgbOIdxEuD\\_oTXVMQHeWrqKWkryJYzXTIKDYGmTqgtX8siTXISyEA](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Colera_actualizaci%C3%B3n_Medicina2010.pdf?fbclid=IwAR1mrZwgbOIdxEuD_oTXVMQHeWrqKWkryJYzXTIKDYGmTqgtX8siTXISyEA)

23. **GARZÓN, D.** "Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas". [En línea] 2013.(Tesis),(Trabajo de Grado) Universidad Tecnica de Ambato (Ecuador). [Consulta: 20 de Febrero del 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3179/1/BQ37.pdf>
24. **GOBIERNO MUNICIPAL DE COLTA - COLTA** "Ubicación Geográfica". (Ecuador, Chimborazo)[En línea] 2009 [Consulta: 14 de diciembre 2018] Disponible en: <https://municipiodecolta.gob.ec/gadcolta/index.php/turismo/patrimonio/historico/9-colta>
25. **GONZÁLEZ, J.** "5 Funciones vitales del agua en tu organismo". [En línea] 2012. [Consulta: 18 de Febrero del 2019]. Disponible en: <https://www.salud180.com/salud-dia-dia/5-funciones-vitales-del-agua-en-tu-organismo>
26. **GUAMÁN, M.** "Difusion de leyendas relacionadas con la Laguna de Cota en niños y niñas de 8 años mediante material didactico". [En línea] 2015, [Consulta: 16 de Febrero 2019] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/5528>
27. **GUTIÉRREZ, M.** "Diseño de un Sendero Interpretativo en las Aguas Termales de Cunuyacu Parroquia Pastocalle, Cantón Latacunga, Provincia De Cotopaxi".[En línea] 2015( Tesis), ( Proyecto de Tesis) Universidad tecnica de Cotopaxi,(Cotopaxi, Ecuador).pp 1-103. [Consulta: 22 de enero 2018] Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2596/1/T-UTC-00133.pdf>
28. **AGENCIA INTERNACIONAL PARA LA INVESTIGACION DEL CANCER** "Evaluación de cinco insecticidas y herbicidas organofosforados" *Environmental Health* Volume 112 , [En línea] 2015, , pp. 425–433. [Consulta: 15 de junio 2018] Disponible en: <https://www.iarc.fr/news-events/iarc-monographs-volume-112-evaluation-of-five-organophosphate-insecticides-and-herbicides/>.
29. **ISLAS, G.** "Determinación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en suelos mediante hplc con derivatización pre-columna". .[En línea] 2013 ( Tesis), (Maestria) Universidad Autónoma del estado de Hidalgo,(Hidalgo, Mexico).pp 1-72. [Consulta: 22 de enero 2018] Disponible en: [https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/14937/Tesis\\_determinacion-glifosato.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/14937/Tesis_determinacion-glifosato.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

30. **KOGAN, M. & ALISTER, C.** "Dinámica del Glifosato en el suelo y su potencial actividad vía absorción radicular". (Chile), [En línea] 2005, pp. 41-50. [Consulta: 16 de mayo 2018] Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7623/1/st-204-2013.-p.41-50.pdf>
31. **LOPEZ, L &.** "Medios de Cultivo". [En línea] 2006, pp. 1-4. [Consulta: 11 de abril 2019] Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>
32. **MÉNDEZ, A. F.** "Aislamiento e identificación de bacterias capaces de degradar", [En línea] 2015( Tesis), ( Trabajo de grado) Universidad ICESI,(Santiago de Cali, Colombia),pp 1-48. [Consulta: 10 de enero 2018] Disponible en: [https://repository.icesi.edu.co/biblioteca\\_digital/bitstream/10906/80978/1/mendez\\_aislamiento\\_bacterias\\_2015.pdf](https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/80978/1/mendez_aislamiento_bacterias_2015.pdf)
33. **MARTÍNEZ, P** "Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de Roundup SL®", *ResearchGate*, [En línea] 2013 ( Ecuador),pp. 1-11 [Consulta: 29 de marzo 2019] Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/259466442\\_Tolerancia\\_Y\\_Degradacion\\_Del\\_Glifosato\\_Por\\_Bacterias\\_Aisladas\\_De\\_Suelos\\_Con\\_Aplicaciones\\_Frecuentes\\_De\\_Roundup\\_Sl/Download](https://www.researchgate.net/publication/259466442_Tolerancia_Y_Degradacion_Del_Glifosato_Por_Bacterias_Aisladas_De_Suelos_Con_Aplicaciones_Frecuentes_De_Roundup_Sl/Download)
34. **MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO COLOMBIA.** "Identificación del herbicida glifosato propiedades y toxicidad. ", [En línea] 2000 *Documento de Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos*, pp. 1–51. [Consulta: 18 de julio 2018] Disponible en: [http://www.mamacoca.org/docs\\_de\\_base/Fumigas/glifosato\\_DNE.pdf](http://www.mamacoca.org/docs_de_base/Fumigas/glifosato_DNE.pdf)
35. **MINISTERIO DEL AMBIENTE PERU.** "Aprende a prevenir los efectos del mercurio módulo 3: agua y alimento". [En línea] 2016.(Peru), [Consulta: 18 de Febrero del 2019]. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/educacion/wp-content/uploads/sites/20/2017/02/Publicaciones-3.-Texto-de-consulta-Módulo-3.pdf>
36. **MOLINA, E.** "Microscopio" [En línea] 2015.[Consulta: 8 de junio 2018]. Disponible en: <https://vanessitamolina.wordpress.com/?s=tincion+gram>
37. **MONDINO, P.** "Métodos de aislamiento", [En línea] 2012 pp. 1–7. [Consulta: 19 de

diciembre 2018] Disponible en:  
<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/05-Metodos de aislamiento.pdf>.

38. **MORENO, L.** "Caracterización de cepas bacterianas de la Laguna Amarilla perteneciente al Nevado El Altar en la Provincia de Chimborazo", [En línea] 2017( Tesis), ( Trabajo de grado) Escuela Superior Politecnica de Chimborazo,(Riobamba, Ecuador ),pp 1-66. [Consulta: 29 de abril 2019] Disponible en:  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7877/1/236T0302.pdf>
39. **OBELA, O. E. L.** "Medio Ambiente y Economía". [En línea] 2012. (Mexico ),[Consulta: 17 de Febrero del 2019]. Disponible en: <http://www.obela.org/contenido/medio-ambiente-economia>
40. **OCAÑA, P.** "Estudio microbiológico de las aguas termomedicinales del parque acuático los Elenes, Cantón Guano, Provincia Chimborazo". [En línea] 2015. .(Tesis),(Trabajo de Grado) Escuela Superior Politecnica de Chimborazo (Ecuador). [Consulta: 20 de Febrero del 2019]. Disponible en:  
[http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4420/1/56T00557\\_UDCTFC.pdf](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4420/1/56T00557_UDCTFC.pdf)
41. **ORTA ARRAZCAETA, L.** "Contaminación de las aguas por pesticidas químicos", *Redalyc.org* [En línea] 2002. (La Habana) [Consulta: 20 de Febrero del 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/2091/209118292006/>
42. **ORTEGA, L.** "La hidrosfera: Contaminación. " [En línea] 2015. [Consulta: 18 de Febrero del 2019]. Disponible en:  
[http://roble.pntic.mec.es/lorg0006/dept\\_biologia/archivos\\_texto/ctma\\_t5\\_hidrosfera\\_contaminacion.pdf](http://roble.pntic.mec.es/lorg0006/dept_biologia/archivos_texto/ctma_t5_hidrosfera_contaminacion.pdf)
43. **PARRA, M., DURANGO, J. and MATTAR, S.** "Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por salmonella",*Revista MVZ Cordoba*, (Colombia), [Consulta: 20 de Abril del 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69370201>
44. **PELUSO, F.** "El agro y la contaminación del agua superficial", [En línea] 2013. (Argentina), [Consulta: 24 de Febrero del 2019]. Disponible en:  
<https://www.unicen.edu.ar/content/el-agro-y-la-contaminación-del-agua-superficial>

45. **PINEDA, H.** (2015) *Técnicas de siembra*. [En línea] 2015.[Consulta: 21 de Febrero 2019]. Disponible en: [https://www.academia.edu/11620994/Técnicas\\_de\\_siembra?auto=download](https://www.academia.edu/11620994/Técnicas_de_siembra?auto=download)
46. **PULIDO, E. y otros** . "Del Bacterioplancton En Lagunas De Alta Montaña", *Pace Pacing And Clinical Electrophysiology*, [En línea] 2003, 22, pp. 8409–8409. [Consulta: 21 de febrero 2019]. Disponible en: [https://www.academia.edu/11620994/Técnicas\\_de\\_siembra?auto=download](https://www.academia.edu/11620994/Técnicas_de_siembra?auto=download)
47. **PROAÑO, N.** "Contaminación de las aguas subterráneas". [En línea] 2011. [Consulta: 20 de Febrero del 2019]. Disponible en: [https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6372/3/Presentación Ing. Olaya.pdf](https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6372/3/Presentación%20Olaya.pdf)
48. **QUINTINILLA, Jorge. y otros** " Evaluación ambiental del lago Colta y su entorno.".*ResearchGate*, [En línea] 2016 ( Ecuador),pp. 1-10 [Consulta: 10 de enero 2019] Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/316148513\\_Environmental\\_Assessment\\_Of\\_Colta\\_Lake\\_And\\_Its\\_Environment](https://www.researchgate.net/publication/316148513_Environmental_Assessment_Of_Colta_Lake_And_Its_Environment).
49. **RÍOS-TOBÓN, S. et al.** "Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano", *Scielo, Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 35(2), [En línea] 2017. (Colombia),pp. 236–247. [Consulta: 18 de Abril del 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf>
50. **RODRÍGUEZ, F.** (2017) "Tinción de Gram - Blog de Laboratorio Clínico y Biomédico". [En línea] 2017, [Consulta: 21 de febrero 2019]. Disponible en: <https://www.franzmn.com/tincion-de-gram/>
51. **ROMERO, C. & CASTAÑEDA, D.** "Determinación de Bacterias en el Aire del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales De La Universidad Distrital Francisco José De Caldas Asociadas A Posibles Afecciones En La Salud. " [En línea] 2015( Tesis), ( Trabajo de grado) Universidad Distrital Francisco José De Caldas ( Bogotá C.D.) pp1-83 [Consulta: 10 de enero 2019] Disponible en: <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/3997/1/RomeroBoh%C3%B3rquezC%C3%A9sarAlberto2015.pdf>

52. **SÁNCHEZ, M. y otros .** "Práctica de Microbiología. "" [En línea] 2015, [Consulta: 3 de junio 2018]. Disponible en: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/home> .
53. **SEMARNAT** "¿Qué microorganismos habitan el agua de mar, lagunas y/o ríos? ". [En línea] 2007. (Mexico). [Consulta: 20 de Febrero del 2019]. Disponible en: <https://agua.org.mx/biblioteca/ique-microorganismos-habitan-el-agua-de-mar-lagunas-yo-rios/>
54. **SERKONTEN, phs** "Contaminación Ambiental:¿Qué es y cómo podemos reducirla? " [En línea] 2017. [Consulta: 17 de Febrero del 2019]. Disponible en: <https://www.phsserkonten.com/sanidad-ambiental/contaminacion-ambiental/>
55. **SERRANO, P.** "Obtención del Consorcio Bacteriano Nativo del Sedimento de la Laguna de Colta Del Cantón Colta". [En línea] 2014( Tesis), ( Trabajo de grado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Chimborazo, Ecuador), pp. 1-146 [Consulta: 20 de diciembre 2018] Disponible en: <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/6586/1/20T00839.pdf>
56. **SUÁREZ, R., ZACCAGNINI, M. and BRODEUR, J.** "Los Agroquímicos y el Ambiente. " *ResearchGate* ,[En línea] 2013. [Consulta: 19 de Febrero del 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/317231324\\_Los\\_Agroquimicos\\_y\\_el\\_Ambiente](https://www.researchgate.net/publication/317231324_Los_Agroquimicos_y_el_Ambiente)
57. **TAROCCO, R., SELJA, V. y VIGNOLI, R.** "Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica", *Temas de Bacterología y Virología Médica*, 36(Cim), [En línea] 2008, pp. 663–671. [Consulta: 28 de febrero 2019]. Disponible en: [10.3989/Pirineos.2010.165006](https://doi.org/10.3989/Pirineos.2010.165006).
58. **TORTORA, G. J., FUNKE, B. R. y CASE, C. L.** *Introducción a la Microbiología*, 9a Edición: Panamericana,2006,pp.1-931
59. **UNIVERSIDAD DE GRANADA ESPAÑA** "Preparacion De Medios De Cultivo Medios De Cultivo" [En línea] 2018, pp. 2–6. [Consulta: 11 de febrero 2019] Disponible en: [https://www.ugr.es/~cjl/medios de cultivo.pdf](https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf).
60. **VARGAS, M.** "Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de aguas de la Laguna de

Colta de la zona central del Ecuador". [En línea] 2019. (Tesis),(Trabajo de Titulación) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. (Ecuador). [Consulta: 20 de Febrero del 2019]. Disponible en: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29298/2/TESISMAYRALOPEZ20190121.pdf>

61. **VEINTIMILLA, A.** "Estudio microbiológico de las aguas termales de Guayllabamba o Aguallanchí situadas en el Cantón Chambo, Provincia de Chimborazo. " [En línea] 2015. (Tesis),(Trabajo de Grado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. (Ecuador). [Consulta: 20 de Febrero del 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4455>
  
62. **VILLALTA, J.** "Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich, Bahía Chile (Continente Antártico) ". [En línea] 2013. (Tesis),(Trabajo de Grado) Universidad de Guayaquil. (Ecuador). [Consulta: 20 de Febrero del 2019]. Disponible en: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3917/1/Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich%2C Bahía Chile \\_Villalta Jose.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3917/1/Estudio%20polifásico%20de%20bacterias%20psicrófilas%20colectadas%20en%20la%20isla%20Greenwich%20Bahía%20Chile_Villalta%20Jose.pdf)
  
63. **WORMS, C. C. N.** "El grave efecto de la agricultura agroquímica sobre las aguas subterráneas". [En línea] 2017. (Argentina). [Consulta: 17 de Febrero del 2019]. <https://wormsargentina.com/el-grave-efecto-de-la-agricultura-agroquimica-sobre-las-aguas-subterraneas/>

## ANEXOS

### ANEXO A Encuesta



**ESPOCH**

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

### ENCUESTA PARA EL PROYECTO DE TITULACIÓN DE LA CARRERA DE ING. EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**Nombre:**

**Fecha:**

**Objetivo:**

- Determinar el conocimiento y uso de la población de Colta sobre los pesticidas

**Instrucciones:**

- Responda a las siguientes preguntas
- La información brindada a la siguiente encuesta será de carácter confidencial

**Encuesta**

**1. ¿Conoce los pesticidas?**

Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

**2. ¿Conoce para que se utilizan los pesticidas?**

Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_ caso \_\_\_\_\_ afirmativo \_\_\_\_\_ ¿para \_\_\_\_\_ qué?

\_\_\_\_\_

**3. ¿Cuáles pesticidas conoce?**

\_\_\_\_\_

**4. ¿Cuál o cuáles pesticidas ha utilizado?**

\_\_\_\_\_

**5. ¿Cuál o cuáles utiliza actualmente?**

\_\_\_\_\_

**6. ¿Ha utilizado algún pesticida casero?**

Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

En

caso

afirmativo

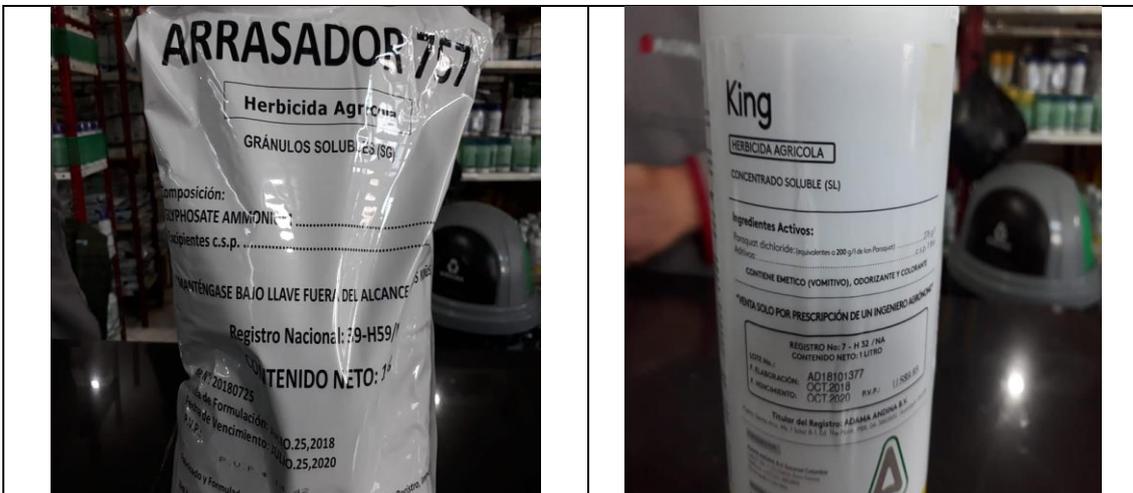
¿Cuál?

7. ¿Qué cantidad de pesticida aplica por hectárea?

8. Con qué frecuencia aplica los pesticida:

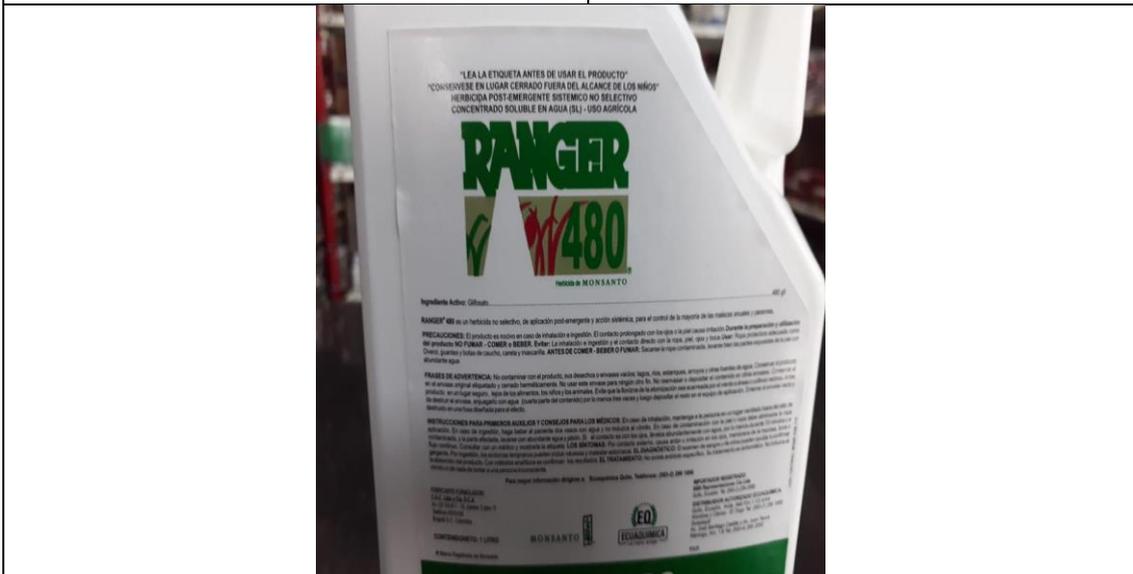
Semanal. ( ) Mensual. ( ) Trimestral. ( ) Otra. ( ) Indique

### ANEXO B Tipos de Pesticidas determinados en la encuesta



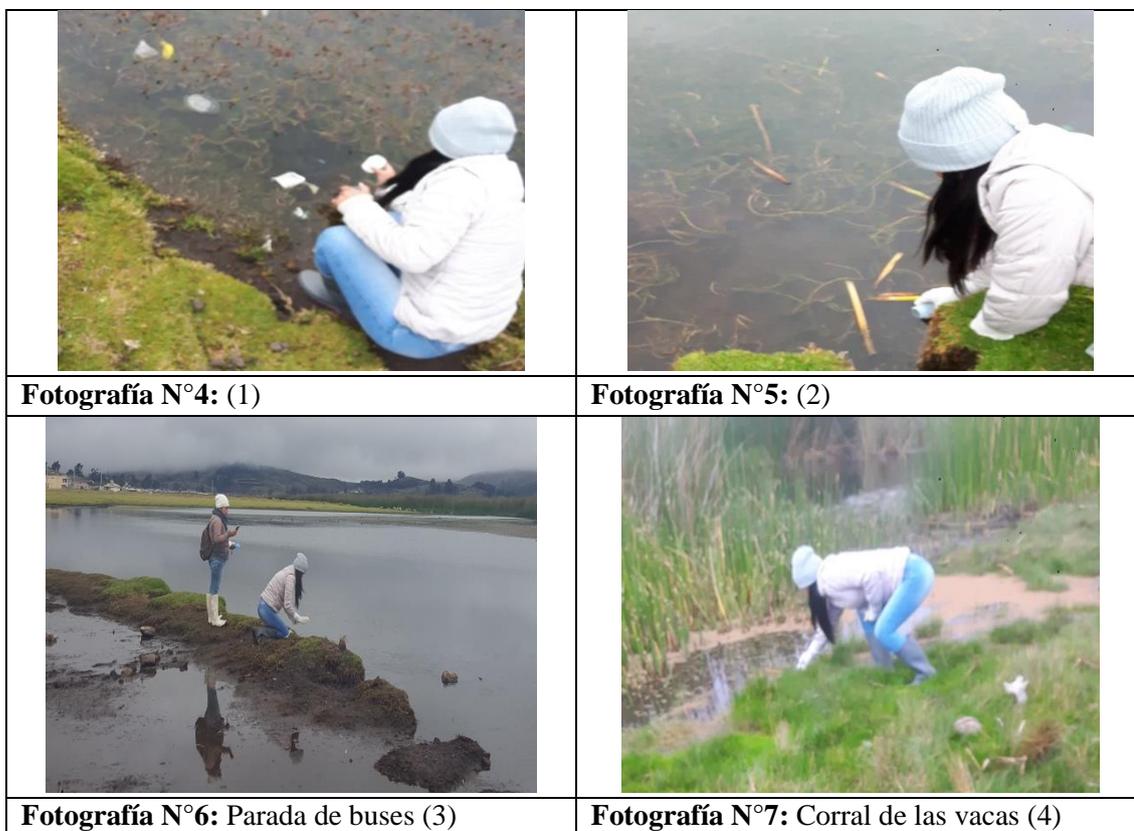
Fotografía N°1: Herbicida Arrasador 757

Fotografía N°2: Herbicida King

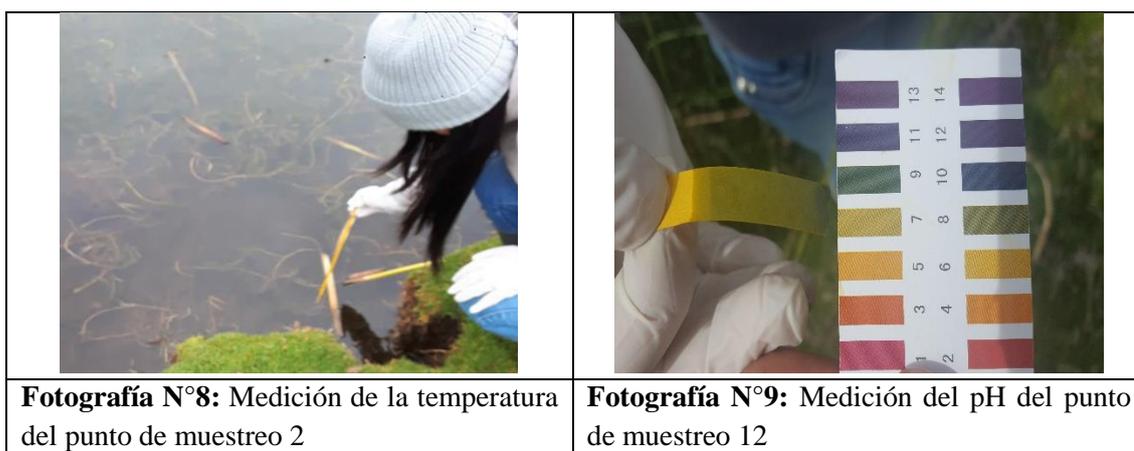


Fotografía N°3: Herbicida Ranger 480

**ANEXO C** Puntos de muestreo para el estudio microbiológico



**ANEXO D** Medición in situ de los parámetros físico-químicos de la laguna

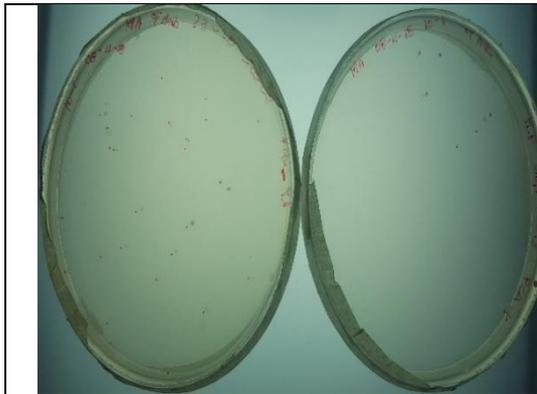


**ANEXO E** Siembra de las muestras del agua de la Laguna en las cajas Petri con PCA, PCA.AL, PCA suplementado con glifosato.

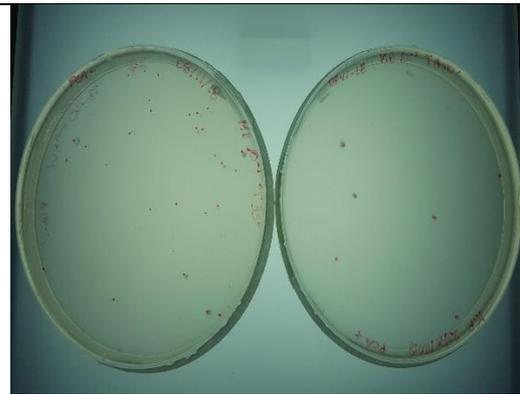


**Fotografía N°10:** Siembra de las muestras del agua de la Laguna en las cajas Petri con PCA, PCA.AL, PCA suplementado con glifosato para el recuento de bacterias.

**ANEXO F** Resultados del recuento bacteriano en cada sitio muestreado trascurrido 24 horas



**Fotografía N°11:** Caja Petri para el recuento bacteriano del sitio MA



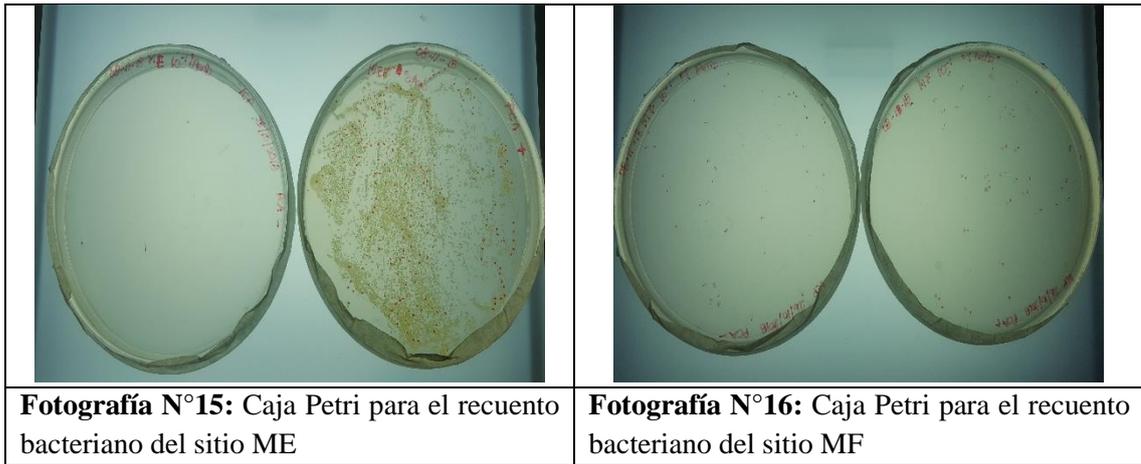
**Fotografía N°12:** Caja Petri para el recuento bacteriano del sitio MB



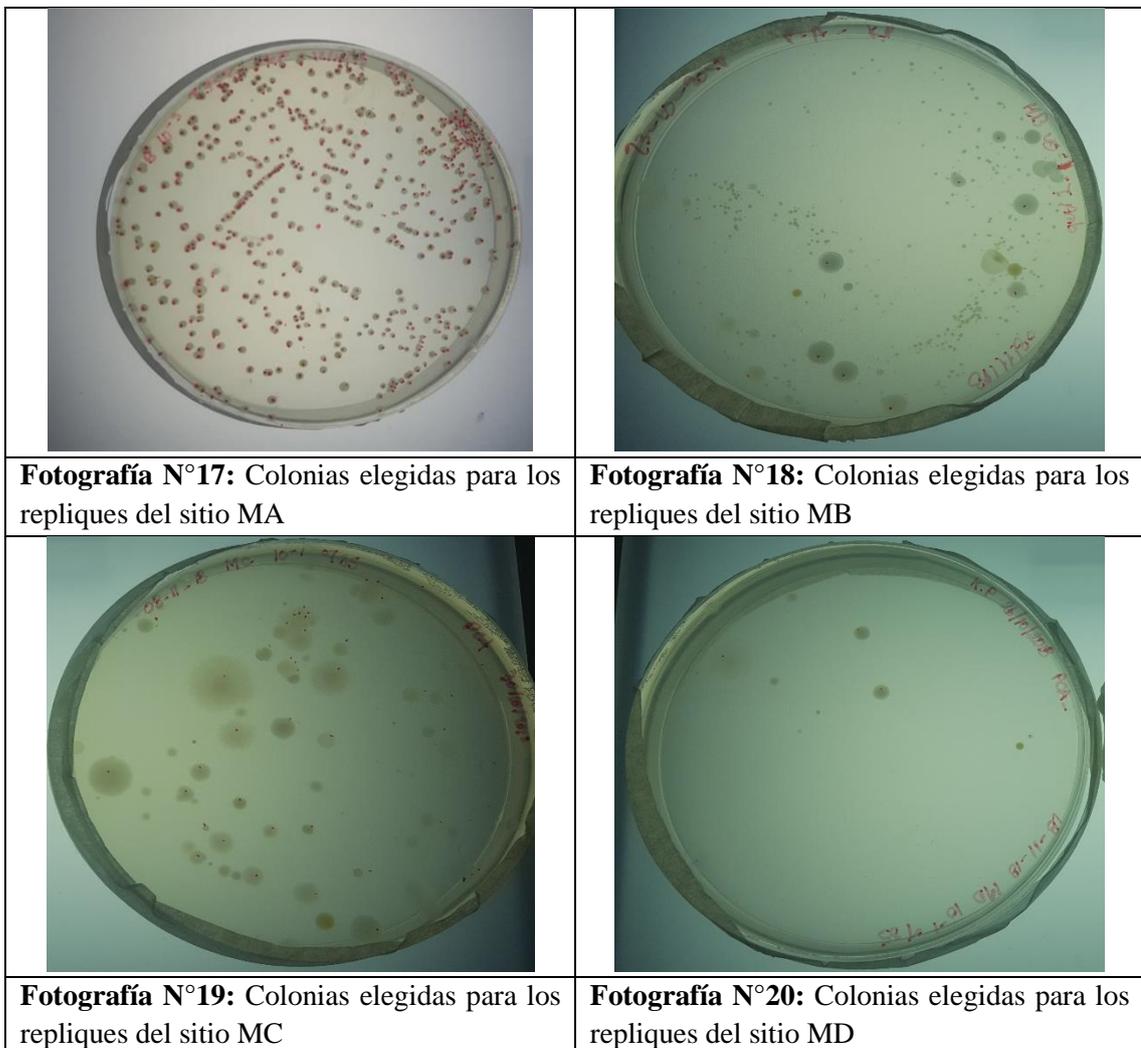
**Fotografía N°13:** Caja Petri para el recuento bacteriano del sitio MC



**Fotografía N°14:** Caja Petri para el recuento bacteriano del sitio MD

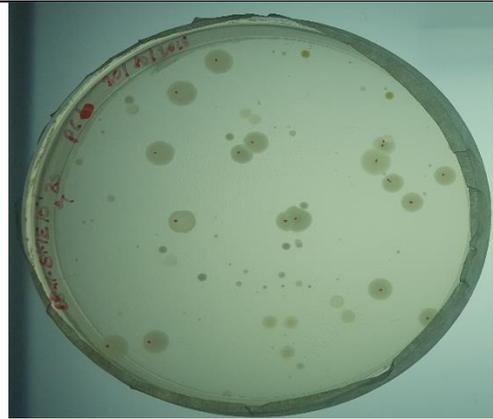


**ANEXO G** Algunas colonias bacterianas que se seleccionaron para los repiques



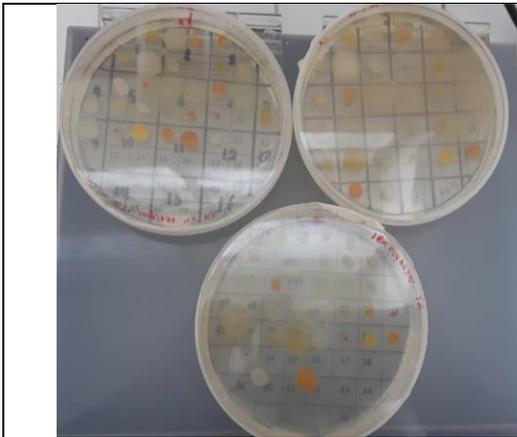


**Fotografía N°21:** Colonias elegidas para los repiques del sitio ME

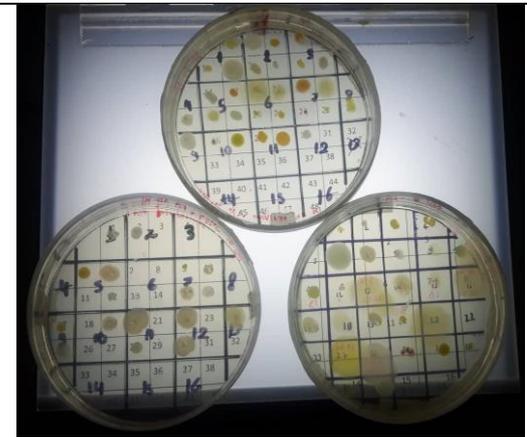


**Fotografía N°22:** Colonias elegidas para los repiques del sitio MF

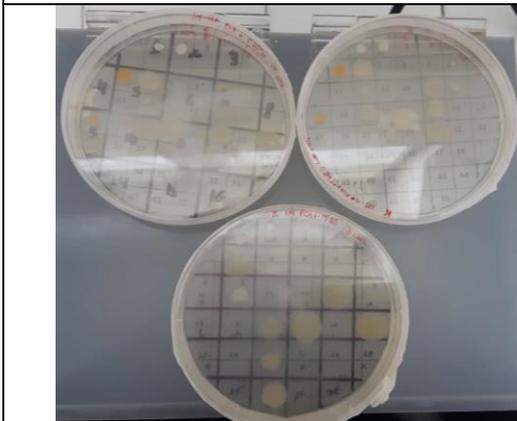
**ANEXO H** Repiques de las colonias bacterianas



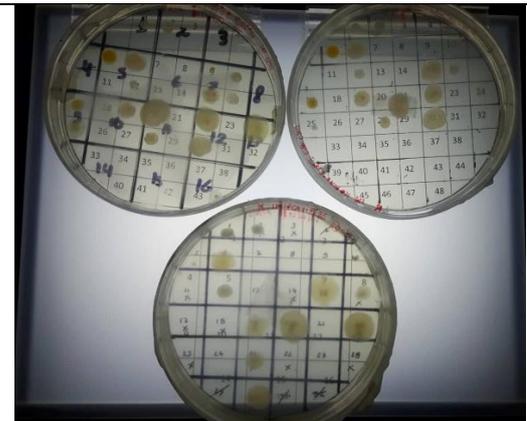
**Fotografía N°23:** Repique uno de los clones del PCA, PCA suplementado con glifosato, PCA.AL a temperatura ambiente



**Fotografía N°24:** Repique uno de los clones del PCA, PCA suplementado con glifosato, PCA.AL a 35°C



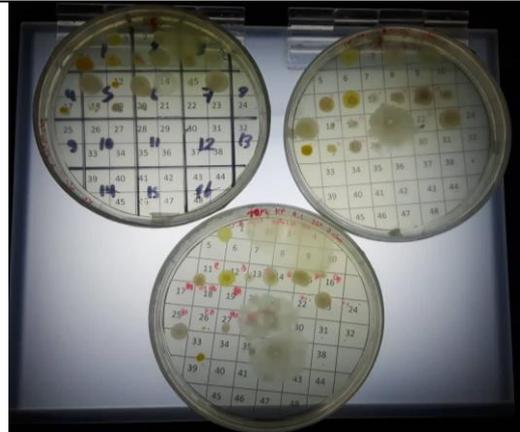
**Fotografía N°25:** Repique dos de los clones del PCA, PCA suplementado con glifosato, PCA.AL a temperatura ambiente



**Fotografía N°26:** Repique dos de los clones del PCA, PCA suplementado con glifosato, PCA.AL a 35°C

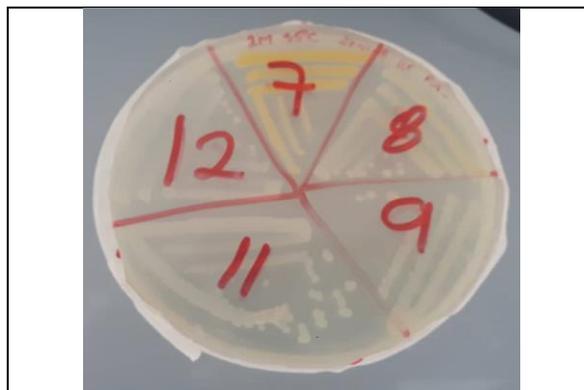


**Fotografía N°27:** Repique tres de los clones del PCA, PCA suplementado con glifosato, PCA.AL a temperatura ambiente



**Fotografía N°28:** Repique dos de los clones del PCA, PCA suplementado con glifosato, PCA.AL a 35°C

**ANEXO I** Siembra de los clones bacterianos por agotamiento de estrías

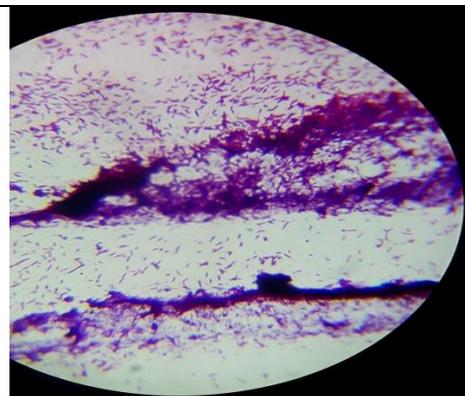


**Fotografía N°29:** Estría por agotamiento de los clones 9, 10, 11, 12 del medio PCA a 35°C

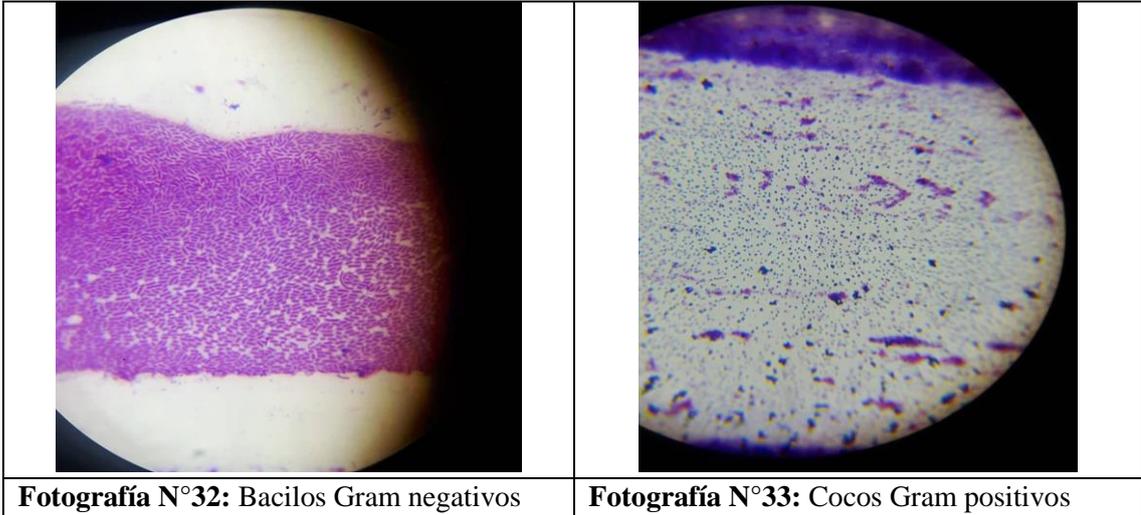
**ANEXO J** Tinción Gram de los clones bacterianos puros



**Fotografía N°30:** placas de la tinción Gram



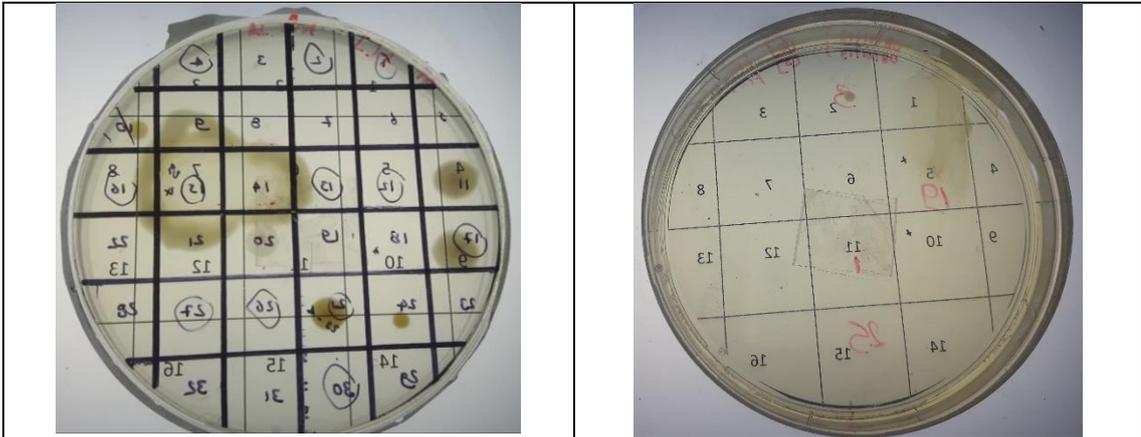
**Fotografía N°31:** Bacilos Gram positivo



**Fotografía N°32:** Bacilos Gram negativos

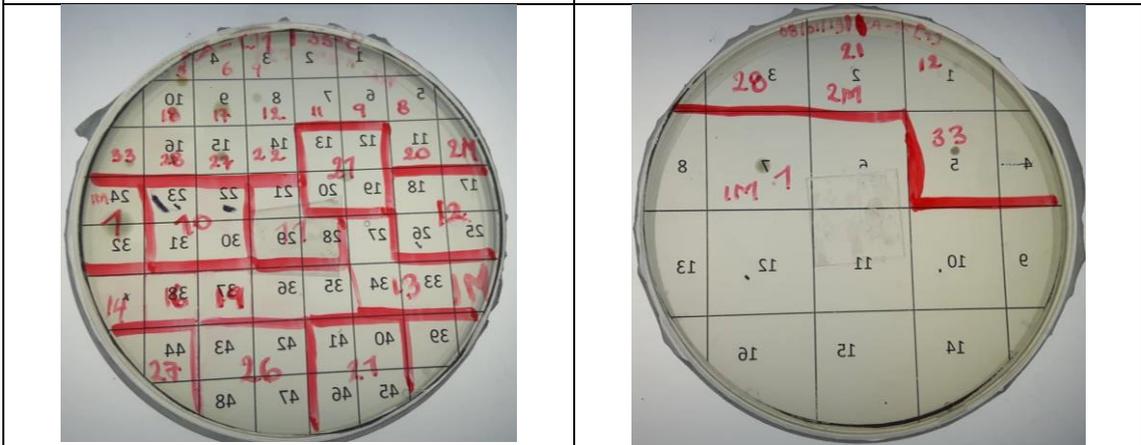
**Fotografía N°33:** Cocos Gram positivos

**ANEXO K** Pruebas de tolerancia al Glifosato



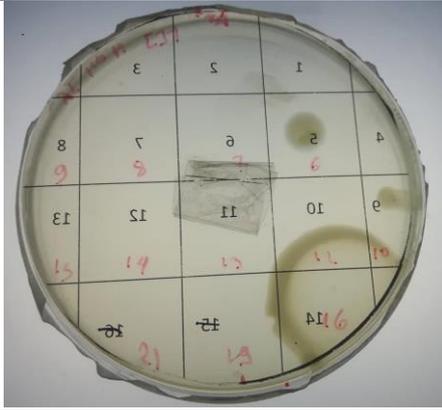
**Fotografía N°34:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA a temperatura ambiente en concentración 1 mL/100mL

**Fotografía N°35:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA a temperatura ambiente en concentración 4 mL/100mL

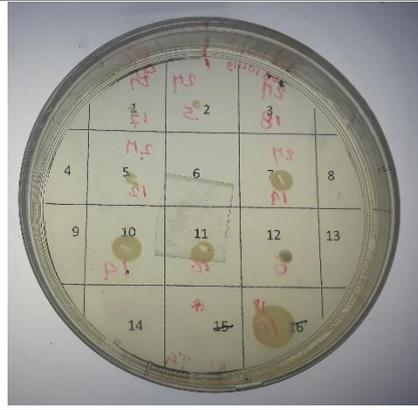


**Fotografía N°36:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA a 35°C en concentración 1 mL/100mL

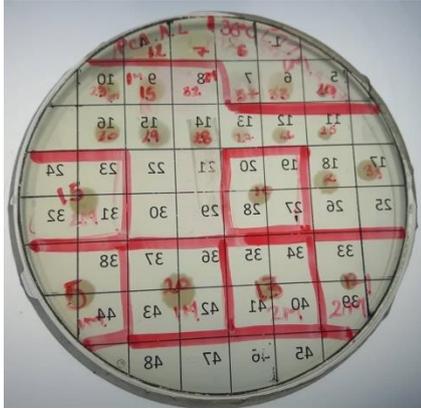
**Fotografía N°37:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA a 35°C en concentración 3 mL/100mL



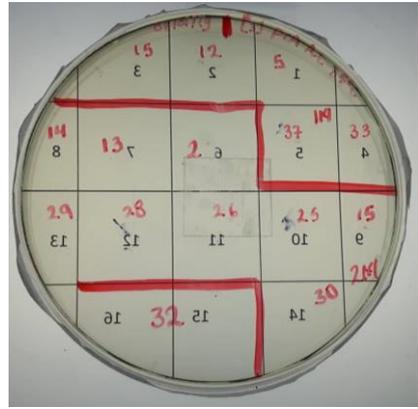
**Fotografía N°38:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA.AL a temperatura ambiente en concentración 1 mL/100mL



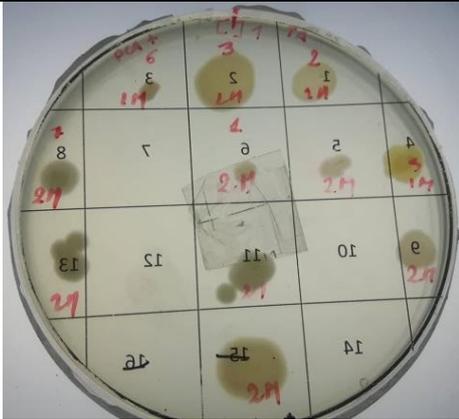
**Fotografía N°39:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA.AL a temperatura ambiente en concentración 4 mL/100mL



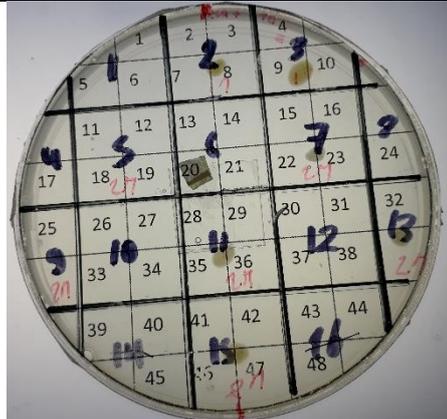
**Fotografía N°40:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA.AL a 35°C en concentración 1 mL/100mL



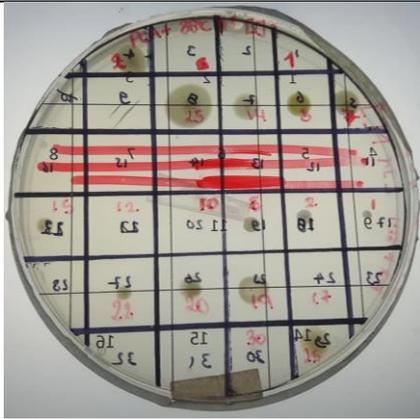
**Fotografía N°41:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA.AL a 35°C en concentración 3 mL/100mL



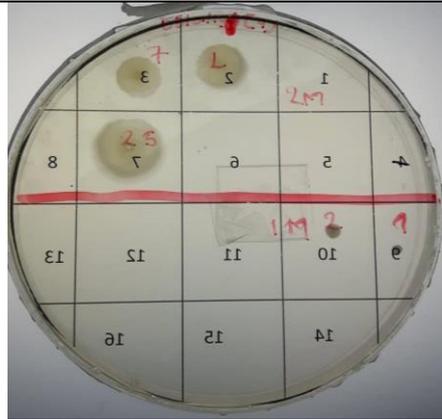
**Fotografía N°41:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA suplementado con Glifosato a temperatura ambiente en concentración 1 mL/100mL



**Fotografía N°42:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA suplementado con Glifosato a temperatura ambiente en concentración 5mL/100mL

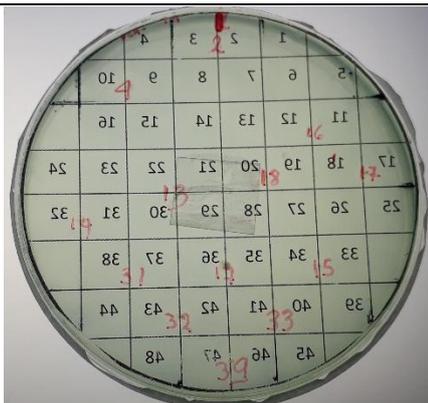


**Fotografía N°42:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA suplementado con Glifosato a 35°C en concentración 1 mL/100mL

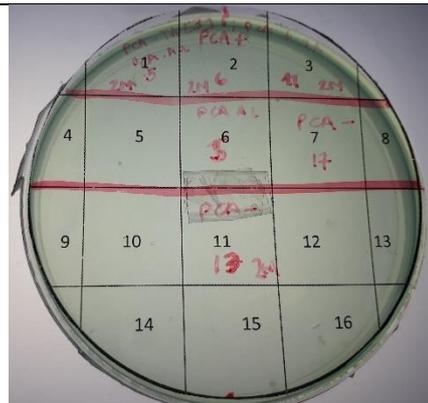


**Fotografía N°43:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA suplementado con Glifosato a 35°C en concentración 5 mL/100mL

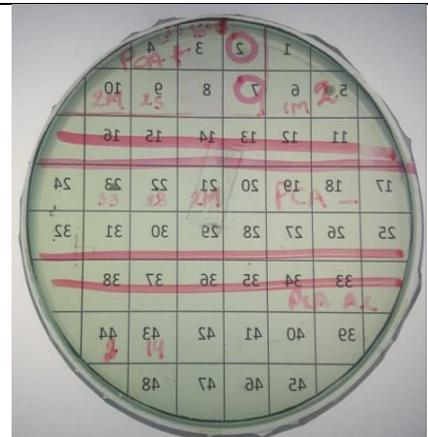
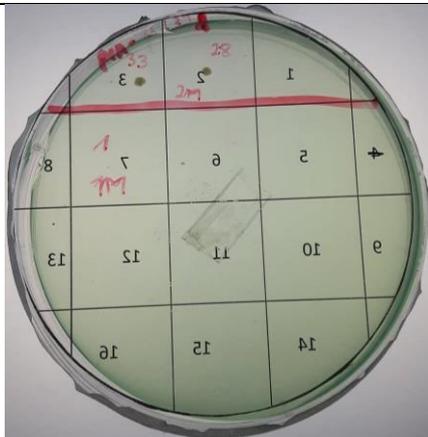
**ANEXO L** Pruebas de tolerancia al Paraquat



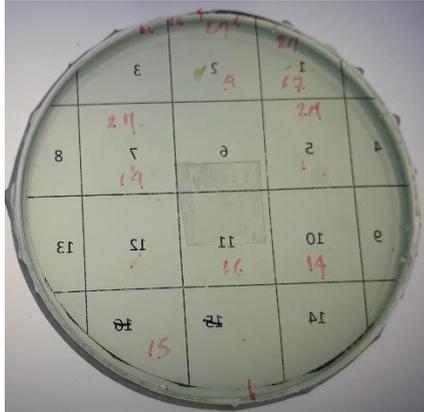
**Fotografía N°44:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA a temperatura ambiente en concentración 1 mL/100mL



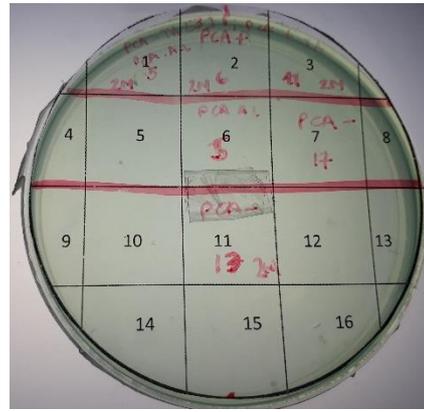
**Fotografía N°45:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA a temperatura ambiente en concentración 3 mL/100mL



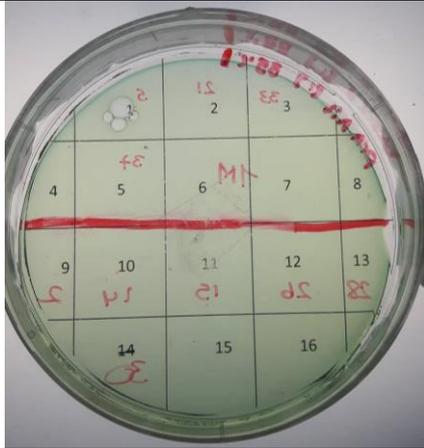
**Fotografía N°46:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA a 35°C en concentración 1 mL/100mL



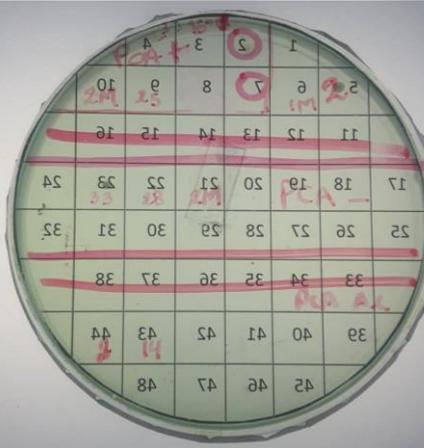
**Fotografía N°47:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA a 35°C en concentración 3 mL/100mL



**Fotografía N°48:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA.AL a temperatura ambiente en concentración 1 mL/100mL



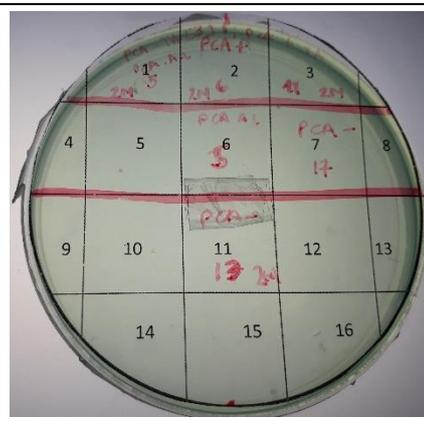
**Fotografía N°49:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA.AL a temperatura ambiente en concentración 3 mL/100mL



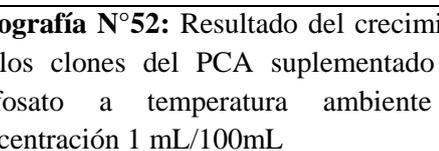
**Fotografía N°50:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA.AL a 35°C en concentración 1 mL/100mL



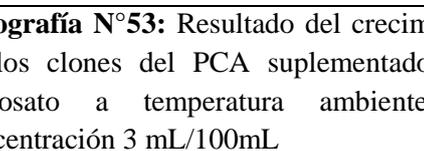
**Fotografía N°51:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA.AL a 35°C en concentración 3 mL/100mL

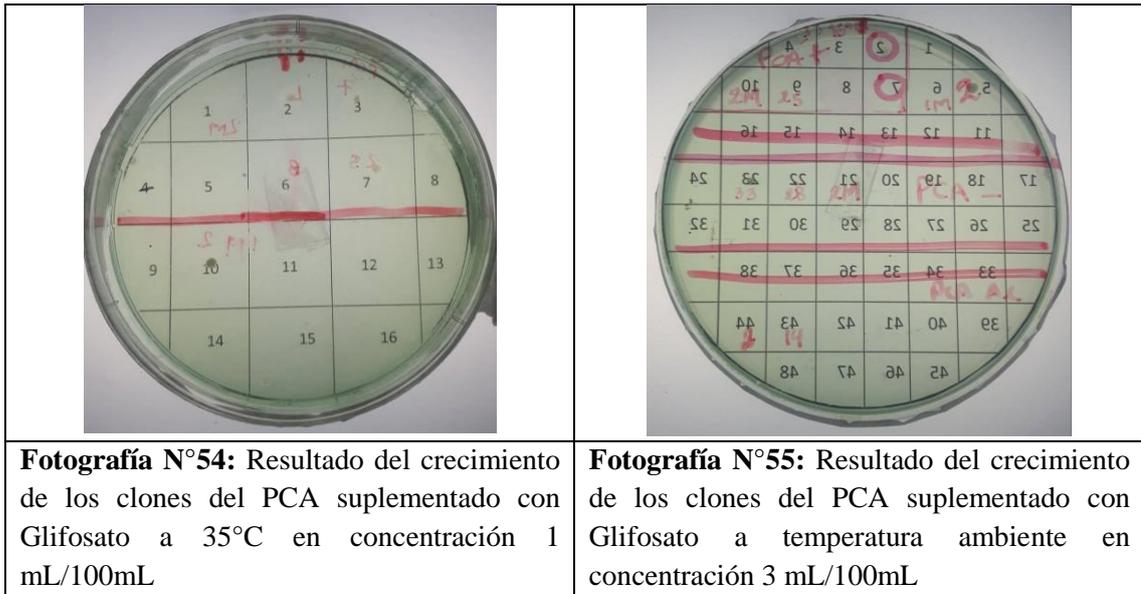


**Fotografía N°52:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA suplementado con Glifosato a temperatura ambiente en concentración 1 mL/100mL

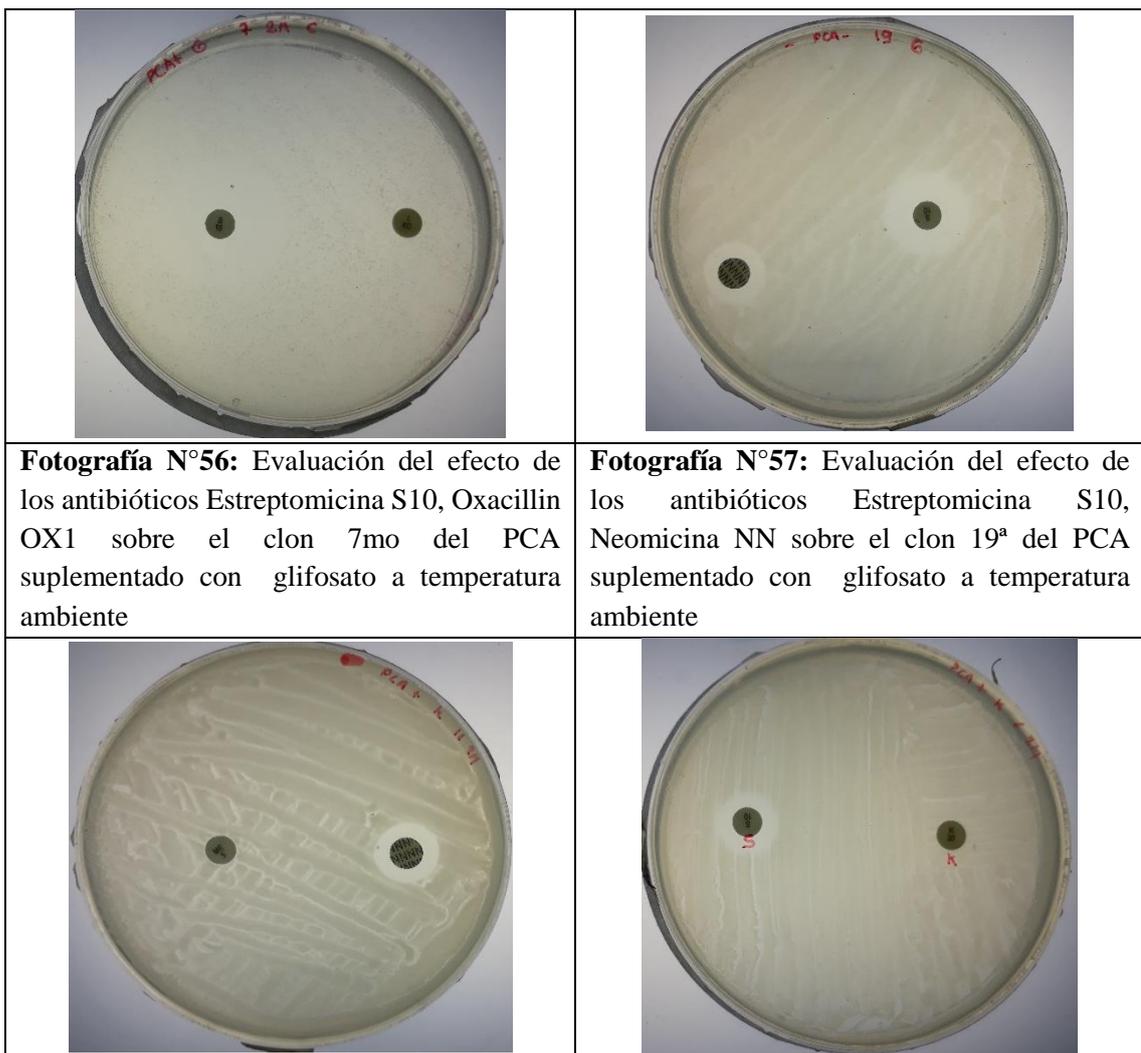


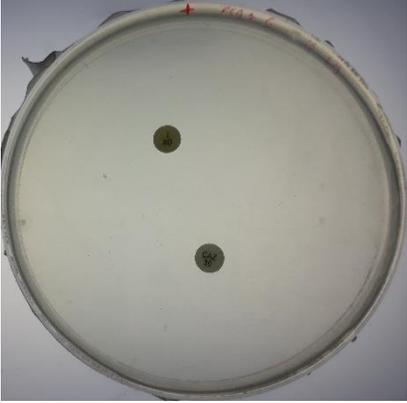
**Fotografía N°53:** Resultado del crecimiento de los clones del PCA suplementado con Glifosato a temperatura ambiente en concentración 3 mL/100mL





**ANEXO M** Antibiograma de los clones bacterianos



<p><b>Fotografía N°58:</b> Evaluación del efecto de los antibióticos Methicillin ME5, Neomicina NN sobre el clon 11<sup>a</sup> del PCA suplementado con Paraquat a temperatura ambiente</p>	<p><b>Fotografía N°59:</b> Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina S10, Kamamycin K30 sobre el clon 6<sup>a</sup> del PCA suplementado con Paraquat a temperatura ambiente</p>
	
<p><b>Fotografía N°60:</b> Evaluación del efecto de los antibióticos Ceftazidime CAZ30, Oxacillin OX1 sobre el clon 15<sup>a</sup> del PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente</p>	<p><b>Fotografía N°61:</b> Evaluación del efecto de los antibióticos Ceftazidime CAZ30, Methicillin ME5 sobre el clon 11<sup>a</sup> del PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente</p>
	
<p><b>Fotografía N°62:</b> Evaluación del efecto de los antibióticos Oxacillin OX1, Ceftazidime CAZ30 sobre el clon 13<sup>a</sup> del PCA suplementado con glifosato a temperatura ambiente</p>	<p><b>Fotografía N°63:</b> Evaluación del efecto de los antibióticos Methicillin ME5, Ceftazidime CAZ30, sobre el clon 5<sup>to</sup> aislados del PCA suplementado con Paraquat a temperatura ambiente</p>



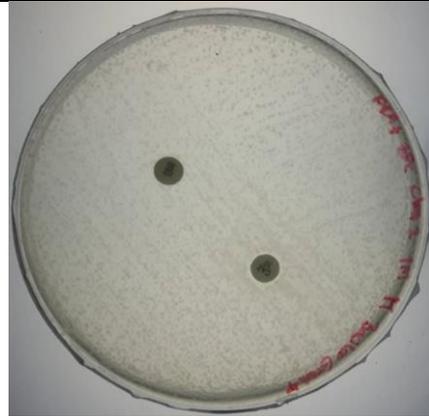
**Fotografía N°64:** Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina S10, Oxacillin OX1, sobre el clon 28b aislados del PCA suplementado con Paraquat a 35°C



**Fotografía N°65:** Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina S10, Oxacillin OX1, sobre el clon 33b del PCA suplementado con Paraquat a 35°C



**Fotografía N°66:** Evaluación del efecto de los antibióticos Estreptomicina S10, Oxacillin OX1, sobre el clon 2a del PCA suplementado con glifosato a 35°C



**Fotografía N°67:** Evaluación del efecto de los antibióticos Cefazolin CZ30, Ceftazidime CAZ30, sobre el clon 2a del PCA suplementado con Paraquat a 35°C



**Fotografía N°68:** Evaluación del efecto de los antibióticos Neomicina NN, Ceftazidime CAZ30, sobre el clon 2b del suplementado con glifosato a 35°C

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA**  
**EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**  
**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS**  
**REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

**Fecha de entrega:** 26/06/2019

<b>INFORMACIÓN DE LAS AUTORAS</b>
<b>Nombres-Apellidos:</b> Catherine Paola Macas Ramírez Katherine Johana Tipantasig Chicaiza
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Ing. En Biotecnología Ambiental
<b>Título a optar:</b> Ingenieras en Biotecnología Ambiental
<b>Documento responsable:</b> Ing. Luis Alberto Caminos Vargas