ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGIENERÍA MARÍTIMA Y CIENCIAS DEL MAR

PROYECTO DE MATERIA DE GRADUACIÓN

"ENSAYOS DEL BIOFILM (*PSEUDOMONA SP*. Y XANTHOMONA SP.) *IN VITRO* PARA LA DEGRADACIÓN DE AGENTES TÓXICOS CONTENIDOS EN PLAGUICIDAS COMO UNA ALTERNATIVA PARA LA BIORREMEDIACION DE AGUAS DULCES"

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

Paz Cabello Michelle Stefany.

Guayaquil - Ecuador

2010

DEDICATORIA

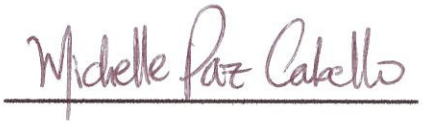
A Dios por darme unos padres maravillosos que me han apoyado en todo a lo largo de este camino.

A mis hermanos para que les sirva de ejemplo y cumplan sus metas.

A la M.Sc Francisca Burgos por todo el apoyo brindado en la elaboración de este proyecto.

Declaración Expresa

"La responsabilidad del contenido de este Trabajo Final de Graduación nos corresponde exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral"



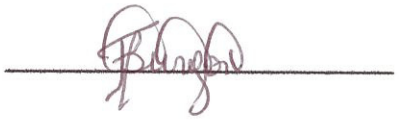
Michelle Paz C.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Conforman el Tribunal los siguientes miembros:

Jerry Landivar M.Sc

PRESIDENTE



Francisca Burgos M.Sc

DIRECTORA

Marcelo Muñoz Ph.D

VOCAL PRINCIPAL

RESUMEN

El presente trabajo trata sobre ensayos del biofilm (*Pseudomona sp. y Xanthomona sp.)* in vitro, para la degradación de agentes tóxicos contenidos en plaguicidas como una alternativa de biorremediación de aguas dulces, en el cual se propone crear un complejo de dichas bacterias hasta alcanzar la concentración ideal del biofilm para degradar el plaguicida carbamato.

Para esto se tomarán muestras de agua del rio Babahoyo, se las colocaran en diferentes peces con la misma concentración de plaguicida y diferentes proporciones del complejo *Pseudomona sp. y Xanthomona sp.*, se harán análisis diarios por HCLP para llevar un control del experimento.

Índice General

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN 1

MARCO TEÓRICO

2.1 Principales fuentes de contaminación de sistemas acuosos 6

2.2 Problemática Ambiental 7

2.3 Carbamatos y su Composición 8

2.4 Efectos sobre la salud Humana 9

2.5 Complejo *Pseudomona sp. y Xanthomona sp.* 11

2.6 OBJETIVOS 12

2.6.1 Objetivo general 12

2.6.2 Objetivos Específicos 12

2.7 Principales Impactos 12

2.7.1 Impactos Científicos 12

2.7.2 Impactos Sociales 13

2.7.3 Impactos Ambientales 13

2.8 RECURSOS Y MÉTODOS 13

2.8.1 RECURSOS 13

2.8.1.1 Biológico 13

2.8.1.2 Instrumentos de Laboratorio 14

2.8.1.3 Material biológico 14

2.8.1.4 Sustrato para el Biofilm 15

2.8.1.5 Recursos Humanos 15

2.8.2 MÉTODOS 15

2.8.2.1 Siembra y Aislamiento 15

2.8.2.1.1 Siembra de Cepa Patrón 15

2.8.2.1.2 Aislamiento de la Colonia 16

2.8.2.2 Ensayos de concentración ideal 16

2.8.2.3 Preparación del Biofilm. 17

2.8.2.4 Conteo bacteriano 18

2.8.2.5 Parámetros abióticos: Ph, temperatura, Oxígeno disuelto y sólidos totales 18

2.9 Actividades: Tabla I 19

2.10 Distribución del presupuesto Tabla II 20

2.11 Cronograma Tabla III 21

3.1 Resultados Esperados 22

3.2 Recomendaciones 23

CONCLUSIONES 23

Índice de Tablas:

Tabla I: Actividades y costos 19

Tabla II: Distribución del presupuesto 20

Tabla III Cronograma 21

Tabla IV: Costo de materiales 27

CAPITULO I:

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN:

El incremento en la producción y uso de compuestos químicos en los últimos cien años ha dado origen a una preocupación creciente sobre el efecto que dichos compuestos pueden tener sobre los ecosistemas terrestre y acuático. Los plaguicidas, debido a sus características químicas, son contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada [1-2].

El uso de plaguicidas se masificó a partir de la segunda guerra mundial, se magnifico desde 1950 a 1986, y está estrechamente vinculado con los cambios introducidos en los modelos de producción y cultivo que duplicaron la productividad de la agricultura respecto al resto de la economía [3].

Los plaguicidas por sí solos son responsables de al menos el 30% de ese aumento de producción. Los países en vías de desarrollo también los han ido empleando cada vez más y en la actualidad, consumen la cuarta parte de productos. Se calcula que por cada unidad monetaria invertida en plaguicidas el agricultor se ahorra pérdidas por valor de unas 3 a 5 unidades de su producción [3].

Actualmente los residuos de estos plaguicidas han sido identificados en todo los sistemas ambientales (aire, agua y suelo), en todas las regiones geográficas incluyendo aquellas muy remotas al sitio original de su liberación ambiental, como océanos, desiertos y zonas polares [4]. Igualmente se ha demostrado su presencia en organismos de todos los niveles tróficos. Estos compuestos se bioacumulan en numerosas especies y se han biomagnificado a través de todas las redes tróficas del mundo. Los seres humanos no están exentos de esta contaminación y los plaguicidas se han podido identificar en diversos tejidos y secreciones humanos, inclusive de los habitantes de regiones muy aisladas [2].

Simultáneamente con el aumento del uso de plaguicidas, crecieron muy significativamente los accidentes y enfermedades asociadas. Según datos de la OMS, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas [5]. De ese total, las 3/4 partes de afectados pertenecen a los países subdesarrollados, donde únicamente se utiliza el 25% de la producción mundial de plaguicidas [5]. Aunque existen dificultades para obtener registros y estadísticas fiables, en nuestro país es consensualmente aceptado que la accidentabilidad asociada al trabajo agrícola es similar o ligeramente superior a la registrada en la construcción.

Las prácticas de biorremediación consisten principalmente en el uso de diferentes organismos (plantas, levaduras, hongos, bacterias, etc.) del medio para neutralizar sustancias tóxicas, bien transformándolas en sustancias de carácter menos tóxico o bien convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana [6]. Una de las medidas biocorrectoras más empleada es la utilización de

microorganismos para la descontaminación de suelos. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por parte de dichos microorganismos, los cuales las utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y de energía para sus funciones metabólicas [7].

La biorremediación utiliza la habilidad de los microorganismos para degradar compuestos orgánicos. Esta tecnología está basada en el uso de organismos naturales o mejorados genéticamente para recuperar sitios contaminados y proteger el ambiente [8].

Las Pseudomonas son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos [9]. La capacidad de estas bacterias para degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica. Vásquez y Reyes (2002) evaluaron tres especies de Pseudomonas para la biodegradación del herbicida Aroclor en 1242. Los resultados obtenidos demuestran la gran capacidad de las bacterias para degradarlo, siendo el porcentaje de degradación de 99,8 - 89,4 y 98,4 respectivamente [10].

La *Pseudomona sp.,* debido a su conformación genética muy versátil; por poseer operones, elementos móviles como plásmidos [11], que permiten la transferencia de los genes [12] y, por lo tanto, la rápida adaptación frente a la presencia de agentes contaminantes nuevos en un ecosistema en particular [1,12].

Además, poseen genes que codifican para enzimas, con las que se lleva a cabo la mineralización del contaminante. Por esta razón es considerada como un agente para la biorremediación.

Ecuador desde 1989 acogió e implemento los enunciados del Código Internacional de Conducta preparado por la FAO. El Gobierno desde 1990 se encontró empeñado en imprimir un sello de calidad en todos los procedimientos legales que puedan ser sensibles a algún tipo de mala interpretación, por lo cual, en 1990 y 1993, promulgó la Ley de Plaguicidas y su reglamento, respectivamente, con el cual se aspira a controlar y normar esta problemática [13].

La asistencia en el contexto del Programa de Cooperación Técnica, ayudará a reforzar la capacidad técnica de los actores involucrados en el sistema de registro y control de plaguicidas, así como en el uso de plaguicidas. Los temas están esencialmente relacionados con la aplicación de prácticas comerciales responsables, la promoción y uso racional y eficiente de plaguicidas, prácticas de manipulación adecuadas, el manejo integrado de plagas, y con referencia a los acuerdos internacionales al respecto. Reforzará también la capacidad técnica del Gobierno para actualizar la legislación nacional Registro Oficial No 343 Jueves 27 de Mayo del 2004 11 relacionada con el tema de plaguicidas con las normas de conducta enunciadas en la versión revisada del 2002 del Código de Conducta [13].

El uso de plaguicidas sigue siendo un factor clave en la producción agraria; sin embargo, la distribución inadecuada y el empleo de plaguicidas y compuestos de elevada toxicidad, puede causar problemas para la salud y el ambiente es por esta razón, que para este trabajo se propone crear este biofilm del complejo *Pseudomona sp.* y *Xanthomona* sp. con el fin de ayudar a mitigar los impactos provocados por uso de plaguicidas en el ambiente; ayudando a transformar los compuestos tóxicos en sustancias menos peligrosas para el ambiente.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Principales contaminantes de sistemas acuosos

El agua es un importante componente de los seres vivos y es factor limitante de la productividad de muchos ecosistemas. La contaminación de los cursos de agua por plaguicidas se produce en forma directa por la aplicación de plaguicidas en las aguas, por lavado de envases o equipos y por descarga de remanentes y residuos.

El agua está considerada como el mayor conflicto del siglo XXI ya que se espera que dentro de pocos años la demanda de ésta sea más del 50 % superior que el suministro. A medida que la población crece se incrementa la necesidad de agua, transformándose en un elemento esencial para el desarrollo. El problema del agua depende de la mala gestión y distribución de los recursos hídricos y sus métodos [14].

Existen varios tipos de contaminantes de las aguas superficiales y subterráneas y por su naturaleza se pueden clasificar en: químicos (sales inorgánicas, ácidos o álcalis, compuestos orgánicos, radioactivos, hidrocarburos, plaguicidas y otros tóxicos), físicos (sólidos y líquidos flotantes, materiales que producen espumas, aguas calientes, materiales suspendidos y sedimentados) y biológico (bacterias patógenas, virus, algas, protozoos y parásitos) [15].

Es igualmente importante la contribución indirecta producida por lixiviación (infiltración) de productos, caída por desniveles y por contaminación de suelos. Las aguas contaminadas expanden el tóxico a la flora y fauna produciendo la muerte de especies, el aumento de la intoxicación humana, la pérdida del curso

de agua como recurso utilizable y la probable contaminación de las reservas hídricas (acuíferos).

2.2 Problemática Ambiental.

Existe una gran cantidad de informes en los cuales se alerta sobre la amplia distribución de plaguicidas en el mundo [16-17]. En los países en desarrollo hay enormes cantidades de plaguicidas tóxicos y/o obsoletos, que son un peligro mortal para la salud humana y el medio ambiente. Se calcula globalmente que hay cientos de miles de toneladas de plaguicidas obsoletos, y que más de 100.000 toneladas de ese total está en los países en desarrollo [18].

Los informes de las Naciones Unidas estiman que de todos los plaguicidas usados en la agricultura, menos del 1% alcanza los cultivos. El resto termina contaminando la tierra, el aire y, principalmente, el agua. Como estos contaminantes son habitualmente no biodegradables y sólo una pequeña cantidad de los residuos son tratados actualmente (por la carencia de tecnologías de tratamiento disponibles in-situ), existe un gran problema de acumulación de consecuencias no predecibles en un futuro cercano. No obstante todas las características nocivas de estos compuestos, la venta de plaguicidas en todo el mundo aumenta sustancialmente todos los años, sobre todo en los países en desarrollo. En 1996, las ventas mundiales de esta industria fueron de 33.000 millones de dólares de las cuales mas del 70 % por ciento se consume en países en vías de desarrollo [19].

2.3 Carbamatos y su Composición.

Derivados del ácido carbámico, tiocarbámico y ditiocarbámico**.** Son sales o ésteres del ácido carbámico o uretano. El primer insecticida introducido fue el Sevin, producto de gran actividad y amplio espectro de acción, siendo además barato, estable y relativamente poco tóxico. Este grupo se corresponde en su mayor parte a derivados del ácido N-metil - carbámico; son de fácil acción sistémica, su persistencia en el ambiente y su toxicidad es intermedia y son fácilmente hidrolizables en soluciones alcalinas.

Los insecticidas de carbamato de N-metilo son muy utilizados en el hogar, jardines y agricultura. Éstos comparten con los organofosfatos, la capacidad de inhibir las enzimas colinesterásicas y por lo tanto comparten una sintomatología similar durante las exposiciones agudas y crónicas. Igualmente, la exposición puede ocurrir por diferentes rutas en la misma persona debido a usos múltiples, y es probable que haya toxicidad adicional con la exposición simultánea a los organofosfatos.

De acuerdo a su composición, sus derivados pueden tener propiedades insecticidas, fungicidas o herbicidas.

Ingresan a los mamíferos a través de la piel, conjuntiva, vía respiratoria y vía digestiva. Son activos inhibidores de la acetilcolinesterasa pero esta 18 inhibición es transitoria, de algunas horas solamente. No se ha demostrado aún neurotoxicidad retardada con ningún carbamato.

Seguidamente se incluyen algunos ejemplos de plaguicidas de Carbamatos más conocidos:

Abol	Lannate
Baygón	Lance
Benlate	Mesurol
Broot	Multamat
Crisfuran	Primin
Curater (Furadán, Carbofurán)	Propoxur
Etrofolan	Sevín
Ficam (bendiocarb)	Temik
Landrín	Vydate L

2.4 Efectos sobre la salud.

El efecto producido como consecuencia de la exposición a un agente tóxico no sólo depende de la cantidad absorbida sino también de la intensidad y duración de la exposición. Se conocen dos tipos principales de intoxicación:

- Intoxicación aguda que da lugar a una alteración grave y se manifiesta en un corto periodo de tiempo.
- Intoxicación crónica que es cuando el tóxico se absorbe en pequeñas cantidades durante un periodo largo de tiempo de la vida del trabajador.

El alto grado de toxicidad de los compuestos organofosforados en los mamíferos, se debe a la fosforilación del ingrediente activo y la consecuente inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que favorece la desactivación de la acetilcolina en el sistema nervioso. La inhibición de la AChE en sangre, cerebro y otros tejidos causa una excesiva estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos del sistema nervioso y, como consecuencia de la acumulación de la acetilcolina a nivel de sinapsis colinérgica, causa varios efectos farmacéuticos que culminan con la muerte por paro respiratorio [20]. Los carbamatos, aunque son de

menor persistencia ya que la AChE se decarbamila rápidamente, también causan inhibición de la AChE; los efectos neurotóxicos son similares a los causados por los organofosforados pero en menor grado con una recuperación usualmente rápida [20].

La medición de la AChE en eritrocitos o en sangre total y la butirilcolinesterasa en plasma son los biomarcadores desarrollados para evaluar exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos [20] ya que representan el blanco molecular de la toxicidad de estos plaguicidas. Cuando la enzima es bloqueada no participa en la hidrólisis de la acetilcolina, lo que conlleva una acumulación del neurotransmisor, produciendo efectos tóxicos que involucran los sistemas parasimpático, simpático, motor y nervioso central [20].

Como en el mundo actual todos estamos expuestos diariamente al contacto y a la ingestión de pequeñas cantidades de plaguicidas y otros productos artificiales, algunos autores sugieren que las consecuencias para la humanidad, a largo plazo, pueden ser serias. Hablan de disminución de la fertilidad, aumento en el número de cánceres, malformaciones congénitas, etc. Aunque no hay evidencia de que esto sea así, tampoco hay completa seguridad de que el efecto a largo plazo de todo este conjunto de sustancias que estamos poniendo en el ambiente sea totalmente inocuo.

2.5 Complejo *Pseudomona sp. y Xanthomona sp*.

Las Pseudomonas son microorganismos ubicuos que se encuentran en la tierra, en la materia orgánica en descomposición, en la vegetación y en el agua.

Existen varios géneros bacterianos estrechamente relacionados con el de Pseudomonas que también tienen una importancia especial: el género Xanthomonas comprende varias especies patógenas vegetales que producen necrosis del follaje.

Estos microorganismos podrían ser unos patógenos más frecuentes, teniendo en cuenta su presencia ubicua, su capacidad de crecer en prácticamente cualquier ambiente, sus propiedades de virulencia y su resistencia a múltiples antibióticos.

Los biofilms bacterianos son formados a partir de células libres del medio ambiente y se definen como un complejo exopolisacárido que rodea a la bacteria en diferentes tipos de superficies. Las células bacterianas en los biofilms a menudo muestran una variedad de diferencias fenotípicas, lo cual incluye cambios como la motilidad, producción de polisacáridos extracelulares e incremento de la resistencia a los antibióticos. La capacidad de las Pseudomonas de formar biofilms rápidamente, constituye la más importante razón por la cual las infecciones por estas bacterias no responden adecuadamente a los tratamientos que se implementan [21]

2.6 OBJETIVOS

2.6.1 Objetivo General:

- Determinar la eficiencia de la biorremediación por la acción del biofilm *Pseudomona sp y Xanthomona sp*. para la degradación de agentes tóxicos contenidos en aguas contaminadas.

2.6.2 Objetivos específicos:

- Determinar la concentración ideal del complejo Pseudomona vs Xanthomona en la degradación de carbamato.
- Establecer la concentración de bacterias necesarias para la biorremediación in vitro.
- Caracterización física y química idónea de las bacterias para el crecimiento del Biofilm.
- Determinar tiempos de degradación.

2.7 Principales Impactos

2.7.1 Impactos Científicos

- Con la realización de este proyecto se podrá determinar la concentración idónea del complejo de biofilm Pseudomona vs Xanthomona en la eliminación de carbamatos contenidos en aguas dulces.
- Esta es una forma alternativa de biorremediación natural eficiente en este tipo de contaminación química.

2.7.2 Impactos Sociales

- Se puede hacer una contención para evitar que la comunidad que se encuentra utilizando esta agua se vea afectada.
- Eliminar los carbamatos ayuda a que la calidad de agua mejore para la producción de diversos cultivos.

2.7.3 Impactos Ambientales

- Habrá una inactivación de compuestos tóxicos en el agua.
- Con el uso del complejo de bacterias *Pseudomona sp. y Xanthomona sp.,* se propone una alternativa amigable con el ambiente en el control de la biorremediación de ecosistemas contaminados. Evitando de esta manera la destrucción de hábitats naturales

2.8 RECURSOS Y METODOS

2.8.1 RECURSOS:

2.8.1.1 Biológico:

Complejo *Pseudomona sp. y Xanthomona sp.* usada a diferentes concentraciones vs. Concentración constaste de carbamato.

2.8.1.2 Instrumentos de laboratorio

- Mecheros
- Vaso de precipitación
- Galón de H2O destilada
- Galón de Alcohol
- Matraz Erlenmeyer 500 ml
- Pipeta 10 ml
- Placas
- Peceras de 10l de vidrio
- Aireadores
- Tubos de ensayo
- Estereoscopio
- Asas de platino
- Asas de vidrio
- Guantes
- Incubadora
- Espectrofotómetro
- Autoclave
- YFI (mide oxígeno, pH, temperatura)
- Balanza electrónica

2.8.1.3 Material biológico

- Muestras de agua tomadas del rio Guayas.

2.8.1.4 Sustrato para biofilm

- Plaguicida carbamato

2.8.1.5 Recursos Humanos

- 1 laboratorista.

2.8.2 METODOS

2.8.2.1 Siembra y Aislamiento

2.8.2.1.1 Siembra de Cepa Patrón

- Con un asa previamente esterilizada, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre un área pequeña de la superficie de la placa con medio de soya dextrosa tripticasa [19], en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para no dañar el agar.
- Se flamea el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite sucesivamente, flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría.
- Se lleva la placa a incubar, a una temperatura óptima de crecimiento a 22°C [18], siempre en posición invertida por 24 h a 48h y se hacen diluciones hasta alcanzar una concentración de 10^6 bacterias por mL lo cual constituye el inóculo bacteriano [22]

2.8.2.1.2 Aislamiento de la Colonia.

- Tomar una colonia de la placa de la cepa patrón una vez incubada y sembrar en una segunda placa, en la que todas las colonias que crezcan deben ser idénticas.
- La inoculación primaria puede hacerse con un asa, isopo u otro material sobre la superficie del medio agarizado en la placa petri o sobre caldos de cultivos.
- A partir de la segunda placa se puede suspender una de las colonias en medio líquido, consiguiéndose ya un cultivo puro.

2.7.2.2 Ensayos de concentración ideal

- Ponemos diferentes concentraciones del complejo Pseudomona sp. y Xanthomona sp. en 3 peceras con 8 litros de agua de río sin ninguna fuente de alimento y con aireación constante y con diferentes concentraciones del complejo de bacterias *Pseudomona sp. y Xanthomona sp*. a 10^7, 10^9, 10^{11}.
- Luego se le vierte 500 ml de carbamatos a cada una de las tres peceras.
- Se las mantiene con aireación por 48 horas.
- Luego se hace el análisis una vez más de carbamatos totales por HCLP (Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia) para obtener la tasa porcentual de efectividad.
- Y se van a realizar 3 controles con el mismo número de peceras 3 con las diferentes concentraciones de 10^7, 10^9, 10^{11} y una de control.

2.8.2.3 Preparación de Biofilm

- Para esta preparación se utiliza 2 matraces Erlenmeyer con una capacidad de 500ml.
- Con el fin de mejorar la eficiencia en el proceso de crecimiento se adiciona un fertilizante compuesto por: KH2PO4. 1.4 g; K 2 HPO 4. 1.7 g; NaNO 1.5 g; MgSO 4 + 7H 2 O 0.5 g; CaCl 2 + 2H 2 O 0.04 g; FeCl 3 ,6H 2 O 0.012 g; y 1 ml del compuesto formado por vitaminas como: Biotina 200mg; Rivoflavina 50mg; Acido Nicotinámico 50mg; Pantotenato 50mg; Acido p-aminobenzóico 50mg; Acido fólico 20mg; tiamina 15mg; Cianocobalamina 1,5mg todos estas disueltas en un litro de agua. [4]
- El aire se suministrará mediante un sistema de inyección en espiral de aire forzado, formado por una tubería plástica acoplada a un compresor que tiene como función bombear el aire.

El sistema en espiral con espaciamiento calculado de 3cm cada punto de inyección de aire en el fondo, permitirá crear zonas alternas de transferencia y mezclado, evitando así la formación de volúmenes muertos (sin movimiento). Todos los orificios fueron colocados en el fondo ya que la profundidad mejora el tiempo de contacto

2.8.2.4 Conteo bacteriano

Se toman muestras de 1 mL de caldo de cultivo a los tiempos 0, 2, 4, 8, 12, 14, 24 y 30 horas con los que se hicieron las diluciones respectivas (Esquivel y Hyaccha,

1996). De cada "dilución de siembra", se tomó 1,0 mL de muestra y se sembró por el método de incorporación en placa utilizando agar cuenta gérmenes (PCA) por duplicado. Las placas se incubaron a 37ºC por 24 a 48 horas, al término de los cuales se hace el recuento de las unidades formadoras de colonias

2.8.2.5 Parámetros abióticos: Ph, temperatura, Oxigeno disuelto y sólidos totales

Se realizara un control diario de los diferentes factores físicos y químicos de muestras tomadas de las peceras por medio de HCLP y así determinar las variaciones y la efectividad.

2.9 Actividades: Tabla I

N	Actividad	Fecha Inicio	Fecha Fin	Recursos Materiales	Recursos Humanos	Costo de la actividad
1	Búsqueda y Selección de Metodología	1/08/2010	1/09/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	$ 400,19
2	Siembra y aislamiento	6/09/2010	10/09/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	$ 600,71
3	Preparación de Biofilm	11/09/2010	16/09/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	$2.074,75
4	Ensayos de concentración ideal	18/09/2010	20/09/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	$1.001,05
5	Conteo bacteriano	21/09/2010	25/09/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	$ 3304,05
6	Tiempo de crecimiento logarítmico	26/09/2010	15/10/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	$3.212,21
7	Realización del informe	17/10/2010	17/12/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	$700,69
COSTO TOTAL PROYECTO						$11.293,65

2.10 Distribución del presupuesto: Tabla II

	ACTIVIDADES	Aporte CICYT (US$)	Otros Aportes Institucionales (US$)	Aporte Externo (US$)	Total (US$)
1	Viajes Técnicos				
2	Capacitación *(pasantías, cursos)*				
3	Equipos (≤50%)		8.470,24	500	8.970,24
4	Libros y Revistas			300	300
5	Materiales y Suministros			1.730	1.730
6	Transferencia de resultados			53,41	53,41
7	Subcontratos y servicios (≤ 20%)			240	240
	TOTAL		8.470,24	2.823,41	11.293,65
	Porcentaje		75%	25%	100%

En esta distribución se pone como base que el CICYT no financiará el proyecto, por lo que los gastos netamente correrán por parte de los alumnos.

2.11 Cronograma: Tabla III

	MESES	1				2				3				4				5				6			
ACTIVIDADES	SEMANAS	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
	Búsqueda y Selección de bibliografía	X	X	X	X																				
	Selección de Metodología	X	X	X	X																				
	Desarrollo del experimento				X	X	X	X	X																
	Pruebas de biorremediación en acuarios									X	X	X	X												
	Análisis de Datos.									X	X	X	X	X	X	X	X								
	Redacción de la Tesis																	X	X	X	X	X	X	X	X
	Realización de tesis en borrador	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

En la tabla 3, se detalla el cronograma de actividades que se deberá llevar a cabo para la realización de este proyecto. La realización del borrador se deberá realizar desde el primer mes hasta el último, para poder mantener actualizada la información.

CAPITULO III

3.1 Resultados Esperados

- Determinar la concentración ideal del complejo *Pseudomona sp. y Xanthomona sp.in vitro*, esta pueda ser utilizada en sistemas in vivo.
- Alcanzar porcentajes mayores a 90 de remoción de Carbamatos sin efectuar un acondicionamiento de los factores abióticos del agua (nutrientes, temperatura, aireación y humedad).

CAPÍTULO IV

RECOMENDACIONES

1. Capacitar adecuadamente al personal de trabajo en el manejo de la bacteria para evitar situaciones de contaminación.
2. Para que el crecimiento de la bacteria en el biofilm sea óptima sin estrés, se deberá medir los parámetros físicos diariamente.
3. Las cantidades de reactivos utilizados deben ser exactas para la efectividad del proyecto.

CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se podrá demostrar la cantidad de Carbamatos que se pueden remover del agua contaminada al utilizar el complejo *Pseudomona sp. y Xanthomona sp.*

2. La aplicación de la técnica de biorremediación para aguas contaminadas, se puede aplicar en un tiempo corto de 6 meses, obteniéndose resultados significativos de remoción.

BIOBLIOGRAFIA:

[1] C.D.S. Tomin, “The Pesticide Manual, a World Compendium”, 11a Edición. British Crop Protection Council. Croydon, UK, 1997.

[2] L.A. Albert, Los plaguicidas persistentes y sus efectos a largo plazo. II Simposio Internacional Sobre Agricultura Sostenible. México D.F., 1998..

[3] Real Decreto sobre reglamentación técnica-sanitaria para fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas. BOE, 1983, 3349: 51-117.

[4] Pesticide Action Network North America, 2000

[5] Olivera S, Rodríguez D, Investigadores del Laboratorio de Neurociencia Molecular (PEDECIBA) Departamento de Neuromiología, Instituto Clemente Estable.

[6] Van JR, Vos WM, Harayama S, Zehnder AJ. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol Rev. 1992;56:677-694.

[7] (Torres, R.D. 2003.). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Ecosistemas 2003/2.

[8] (Miller y Poindexter,1994), Marivela *et al.*

[9] Golovleva, L., Aharonson, R., Greenhalg, N., Sethunathan, N. y Vonk, W. 1990. The rol and limitations of microorganism in the conversión of xenobiotics. Puer and apl.. Chem 62: 351-364.

[10] Vásquez y Reyes (2002) evaluaron tres especies de Pseudomonas para la biodegradación del herbicida Aroclor en 1242.

[11] Chakrabarty AM. Plasmids in Pseudomonas. Annu Rev Genet. 1976;10:7-30.

[12] Sussman M, Collins CH, Skinner FA. Stewart DE. Release of genetically-engineered microorganisms. London: Academic Press; 1988.

[13] 0335 Proyecto Apoyo a la Aplicación de las Especificaciones del Código Internacional de Conducta en el Registro y Control de Plaguicidas. Registro Oficial. 27 de MAYO del 2004

[14] (http://www.ecojoven.com/tres/10/acuiferos.html, junio 2007; http://waste.ideal.es/aguaguerra.htm, junio 2007).

[15] Hill, 1997; García, 1989; Serrano y col., 2006.

[16] E. E. Sitarska, W. Klucinski, R. Faaundez, A. Duszewka, A. Winnicka y K. Goralezyk, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 55(6), 858-869 (1993).

[17] A.R. Nair, P. Mandapati, P.Dureja y M. Pallai, Bull. Environ. Cont. Toxicol., 56(1), 58-64 (1996).

[18] Organización Mundial de la Salud (OMS), Investigación en Salud y Ambiente XXXIII Reunión del Comité; Asesor de Investigaciones en Salud de la Organización Panamericana de la Salud, OPS/CAIS/98.05, Caracas, Venezuela, 1998.

[19] Asociación Nacional de la Industria Química (ANIQ), *Anuario estadístico de* la industria química mexicana 1996. Mexico D.F., 1996.

[20] Silva E, Morales L, Ortiz J. Evaluación epidemiológica de plaguicidas inhibidores de acetilcolinesterasa en Colombia, 1996-1997. Biomédica 2000; 20:200-9.

[21] Yetkin G, Otlu B, Cicek A, Kuzucu C, Durmaz R. Clinical, microbiologic, and Epidemiologic Characteristics of Pseudomonas Infections in a University. Am J Infect Control 2006;34:188-92.

[22] Esquivel y Huaccha, 1996.

ANEXOS

Tabla 4: Costos de materiales, medios, reactivos, equipos, recursos bibliográficos y análisis a utilizar en nuestro proyecto

Materiales Laboratorio	**Precios Unitario**	**Cantidad**	**Total $**
Mecheros	$ 8,00	5	$ 40,00
Vaso de precipitación	$ 12,00	5	$ 60,00
Galón de H2O destilada	$ 1,55	4	$ 6,20
Galón de Alcohol	$ 6,00	4	$ 24,00
Matraz erlenmeyer 500 ml	$ 13,00	4	$ 52,00
Pipeta 10 ml	$ 3,50	5	$ 17,50
Placas	$ 2,87	6	$ 17,22
Peceras de 8L de vidrio	$ 50,00	5	$ 250,00
Aireadores	$ 20,00	5	$ 100,00
Tubos de ensayo	$ 0,25	6	$ 1,50
Estereoscopio	$ 350,00	1	$ 350,00
Asas de platino	$ 16,32	5	$ 81,60
Asas de vidrio	$ 4,00	5	$ 21,63
Guantes	$ 4,00	5	$ 20,00
Incubadora	$ 1.200,00	1	$ 1.400,00

Espectrofotómetro	$ 3.600,00	1	$ 3.800,00
Autoclave	$ 342,00	1	$ 402,00
YFI (mide oxigeno, pH, temperatura)	$ 3.000,00	1	$ 3.200,00
Balanza electrónica	$ 50,00	1	$ 50,00
		Subtotal	$ 9.893,65

Medio de Cultivo Solido	**Cantidad**	**Precio**
Soya dextrosa tripticasa	500g	320
	Subtotal	320

Sustrato para biofilm	**Cantidad**	**Precio**
Carbamato	1kg	$ 50

Recursos Bibliográficos	**Precio**
Biología de microorganismos de Brocks	130
Internet	150
Computadora	700
Tinta	50

COSTO TOTAL	**$** 11.293,65