

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TESINA DE GRADO

Biodegradación del xenobiótico
P-Nitrofenol en medio acuoso por la
cepa bacteriana *Enterococcus gallinarum*
aislada de residuos de granja

TESISTA

JULIETA CELESTE MARTÍN TEMPESTTI

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERA EN RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**



MENDOZA, ARGENTINA. AÑO 2023



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



전북대학교
CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY

Biodegradación del xenobiótico P-Nitrofenol en medio acuoso por la cepa bacteriana *Enterococcus gallinarum* aislada de residuos de granja.

Autora

Julieta Celeste Martín Tempestti
jcmartin@est.fca.uncu.edu.ar

Director

Harshavardhan Mohan
harsha.jia@jbnu.ac.kr

Codirector

Iván Funes Pinter
ifunespinter@fca.uncu.edu.ar

Comisión Evaluadora

Silvina Andrea Farrando
sfarrando@fca.uncu.edu.ar

María Laura Flores Cáceres
mflores@fca.uncu.edu.ar

María Cecilia Salinas
ceciliasalinas2005@gmail.com

ABSTRACT

Water and soil pollution pose a problem that challenges humanity as a whole. Large regions of the planet currently suffer from water scarcity, yet there are industries that continue to discharge their effluents into waterways with little to no treatment. One of the compounds causing pollution is P-Nitrophenol, a xenobiotic used in the production of pharmaceuticals, fungicides, insecticides, dyes, and leather darkening. However, this organic compound is harmful to plants, animals, and humans through ingestion, inhalation, or skin contact. Moreover, it has severe environmental effects as it bioaccumulates, increasing its concentration as it escalates through the food chain. In response to this issue, this study analyzed the potential use of a bacterial strain for treating water contaminated with P-Nitrophenol.

The hypothesis posited in the study asserts that among the 17 previously isolated bacterial strains, at least one has the capability to biodegrade the compound P-Nitrophenol, thereby reducing the toxicity of the treated water. Consequently, the objective of this work was to diminish the toxicity of liquid media contaminated with P-Nitrophenol by selecting a bacterial strain capable of metabolizing it and optimizing laboratory conditions. Specifically, the study aimed to: (1) select a bacterial strain capable of tolerating high concentrations of P-Nitrophenol (bioinhibitory concentrations); (2) Characterize the biodegradation of P-Nitrophenol at different concentrations, pH levels, and inoculum doses; (3) determine the optimal initial concentration of P-Nitrophenol, inoculum dose, and pH for bacterial biodegradation; (4) ascertain the biodegradation of P-Nitrophenol in an environmental matrix (river water); (5) assess the effectiveness of P-Nitrophenol biodegradation through phytotoxicity assays; and finally, (6) identify the selected strain using molecular techniques.

The experimental stages of the study were carried out in the Bioremediation Laboratory of the Faculty of Biotechnology at Chonbuk University, Iksan-si. The optimized laboratory variables (pH level, inoculum dose, and initial P-Nitrophenol concentration) were determined through monofactorial experiments. The bacteria were cultivated in aqueous LB (Luria Bertani) broth, and various laboratory conditions were altered to find the combination that achieved the highest compound degradation. By analyzing GC-MS and HPLC data, the percentage of P-Nitrophenol biodegradation was determined for each treatment day, leading to the identification of optimal biodegradation conditions.

Out of the 17 bacterial strains isolated from pig farm residues, *Enterococcus gallinarum* was selected for its ability to degrade the xenobiotic. Results indicated that the optimal scenario for P-Nitrophenol biodegradation by *E. gallinarum* was an initial concentration of 100 mg L⁻¹ of P-Nitrophenol, pH 7, 3% v/v inoculum dose, and 30°C. Once these optimal conditions were established, it was observed that the bacteria were capable of degrading over 96% of the contaminant within 4 days. Additionally, phytotoxicity studies with *Vigna radiata* (mung bean)

seeds demonstrated effective biodegradation of the xenobiotic. Furthermore, an environmental matrix study using river water showed the bacteria's extensive capacity to biodegrade the xenobiotic, even under different scenarios.

In conclusion, this research revealed that the bacterial strain *Enterococcus gallinarum* possesses the ability to metabolize the xenobiotic P-Nitrophenol, reducing its concentration to levels compatible with life. However, its applicability in the field remains unknown, urging further investigation to explore the potential application of this biotechnology under real conditions as a tool for treating water contaminated with the xenobiotic. Bioremediation is a rapidly expanding field in terms of treating recalcitrant pollutants, offering immense potential. Continued investment in such technologies is considered essential to mitigate the environmental degradation caused by humanity. Bioremediation provides a clean, low-cost solution applicable in various scenarios.

RESUMEN

La contaminación de cuerpos de agua y suelo es un problema que interpela a la humanidad en su conjunto. Grandes regiones del planeta sufren actualmente escases de agua, y sin embargo, existen industrias que continúan desechando sus efluentes en cauces sin previo o con mínimo tratamiento. Uno de los compuestos que causa contaminación es el P-Nitrofenol, un xenobiótico utilizado en la fabricación de fármacos, fungicidas, insecticidas, tinturas y para oscurecer cuero. No obstante, este compuesto orgánico es nocivo en plantas, en animales y en humanos tanto por ingestión, inhalación o contacto con la piel, además produce severos efectos ambientales ya que se bioacumula, aumentando su concentración con el avance en la red trófica. En respuesta a esta problemática, en este estudio se analizó la posibilidad de emplear una cepa bacteriana para el tratamiento de aguas contaminadas por P-Nitrofenol.

La hipótesis planteada en el estudio sostiene que, entre las 17 cepas bacterianas previamente aisladas, al menos una de ellas tiene la capacidad de biodegradar el compuesto P-Nitrofenol, lo que reduciría la toxicidad del agua tratada. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue disminuir la toxicidad de un medio líquido contaminado con P-Nitrofenol mediante la selección de una cepa bacteriana capaz de metabolizarlo y la subsiguiente optimización de las condiciones de laboratorio. En particular se buscó: (1) seleccionar una cepa bacteriana capaz de tolerar elevadas concentraciones de PNP (bioinhibitorias); (2) Caracterizar la biodegradación de PNP a concentraciones seriadas del mismo, niveles de pH y dosis de inóculo; (3) seleccionar la concentración inicial de PNP, dosis de inóculo y pH donde la biodegradación por parte de la bacteria sea óptima; (4) determinar la biodegradación del PNP en una matriz ambiental (agua de río); (5) determinar la eficacia de la biodegradación de PNP mediante ensayos de fitotoxicidad y finalmente, (6) identificar mediante técnicas moleculares la cepa seleccionada.

Las etapas experimentales del estudio se llevaron a cabo en el laboratorio de biorremediación de la Facultad de Biotecnología en la Universidad de Chonbuk, Iksan-si. Las variables de laboratorio optimizadas (nivel de pH, dosis de inóculo y concentración inicial de PNP) se llevaron a cabo mediante experimentos monofactoriales. La bacteria fue cultivada en caldo LB (Luria Bertani) acuoso y se alteraron las distintas condiciones de laboratorio para encontrar aquella que lograra la mayor degradación del compuesto. Mediante análisis GC-MS y HPLC, se determinó el porcentaje de biodegradación de P-Nitrofenol de cada día de tratamiento. De esta manera se hallaron las condiciones óptimas para la biodegradación.

De las 17 cepas bacterianas aisladas a partir de residuos de una granja porcina, *Enterococcus gallinarum* fue seleccionada por su capacidad de degradación del xenobiótico. Los resultados indicaron que el mejor escenario para la biodegradación de P-Nitrofenol por parte de *E. gallinarum* fue de 100 mg L⁻¹ de PNP inicial, pH 7; 3% v/v de dosis de inóculo y 30 °C. Una

vez determinadas estas condiciones óptimas, se constató que la bacteria fue capaz de degradar más del 96% del contaminante en 4 días. Además, se complementó con estudios de fitotoxicidad con semillas de *Vigna radiata* (poroto mung) y los resultados indicaron que el xenobiótico fue biodegradado eficazmente. Asimismo, se realizó un estudio utilizando una matriz ambiental, en este caso agua de río, y se demostró que la bacteria tuvo la capacidad de biodegradar ampliamente el xenobiótico, incluso en distintos escenarios.

En conclusión, esta investigación demostró que la cepa bacteriana *Enterococcus gallinarum* tiene la facultad de metabolizar el xenobiótico P-Nitrofenol, llevando su concentración a niveles compatibles con la vida. Sin embargo, aún se desconoce su aplicabilidad en territorio, por lo que se invita a seguir profundizando la investigación con el objetivo de examinar la posibilidad de aplicar esta biotecnología en condiciones reales, como herramienta para el tratamiento de aguas contaminadas con el xenobiótico.

La biorremediación es un campo en continua expansión en lo referido al tratamiento de contaminantes recalcitrantes y presenta un inmenso potencial. Se considera imprescindible seguir invirtiendo recursos en este tipo de tecnologías a fin de reparar el deterioro ambiental causado por la humanidad. La biorremediación ofrece una solución limpia y de bajo costo, que puede ser aplicada en diversos escenarios.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por su amor incondicional y apoyo inquebrantable a lo largo de este recorrido. Me enseñó lo importante que es ser buena persona y tener valores fuertes. Mis logros son y serán un reflejo de su dedicación y constante aliento. También a mi papá, quienes, gracias a su sacrificio y esfuerzo diario, me brindaron la oportunidad de estudiar mientras ellos salían a trabajar. El sólido sostén de mi familia ha sido fundamental en mi trayectoria académica.

A mis cinco hermanas, ejemplares como personas, profesionales y amigas, han sido mi faro y modelo a seguir desde que tengo razón. Gracias por siempre demostrar valentía y lucha ante cualquier circunstancia.

A Marco, quien me ha acompañado sin importar la distancia o la situación. El que me ha ayudado a apreciar el presente, darme cuenta donde estamos parados y disfrutar un poco más del día a día. Con quien también soñamos a futuro y de esa manera todo este esfuerzo cobra sentido.

A mis amigos y amigas de la Facultad de Ciencias Agrarias, excelentes personas y profesionales, quienes hicieron que el proceso de aprendizaje sea no solo enriquecedor sino también entretenido. Personas que espero conservar en mi vida más allá del ámbito académico.

A mi director Harshavardhan, gracias a su deseo de compartir conocimiento rompiendo barreras lingüísticas y culturales. Su confianza me dio la seguridad necesaria para aceptar el proyecto y su humildad y solidaridad me permitieron integrarme rápidamente y aprender de cada etapa del proceso.

A mi codirector Iván, quien me enseñó a escribir y ordenar mis ideas. Le agradezco por siempre demostrar predisposición a resolver mis inquietudes y por el constante seguimiento de mis avances. Su compromiso fue vital para el desarrollo de esta tesis.

A las instituciones que nos brindaron acceso a recursos y materiales necesarios para llevar a cabo esta investigación. También a las personas que ayudaron en la etapa experimental de este proyecto, miembros becarios del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Chonbuk.

CONTRIBUCIONES

- ❖ Harshavardhan Mohan: Metodología y tutoría en laboratorio.
- ❖ Pavithra Muthukumar Sathya y SeWon Lee: Experimentación y aislamiento bacteriano.
- ❖ Kamala-Kannan Seralathan: Supervisión y adquisición de fondos.
- ❖ Iván Funes Pinter: Supervisión, análisis estadístico y redacción.

PALABRAS CLAVE

Biodegradación, *Enterococcus gallinarum*, P-Nitrofenol, Fitotoxicidad.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 FUNDAMENTACIÓN	- 1 -
1.2 HIPÓTESIS	- 4 -
1.3 OBJETIVOS	- 4 -
1.3.1 Objetivo general	- 4 -
1.3.2 Objetivos específicos	- 4 -
1.4 MARCO TEÓRICO	- 5 -
2. MATERIALES Y MÉTODOS	- 10 -
2.1 PRIMERA ETAPA: SELECCIÓN DE UNA CEPA RESISTENTE A PNP	- 10 -
2.2 SEGUNDA ETAPA: ESTUDIOS PRELIMINARES	- 11 -
2.3 TERCERA ETAPA: BÚSQUEDA DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE BIODEGRADACIÓN	- 12 -
2.3.1 ANÁLISIS QUÍMICO DE BIODEGRADACIÓN DE PNP	- 12 -
2.3.2 CONDICIONES EVALUADAS	- 12 -
2.3.2.1 CONCENTRACIÓN INICIAL DE PNP	- 12 -
2.3.2.2 pH	- 13 -
2.3.2.3 DOSIS DE INÓCULO	- 13 -
2.4 CUARTA ETAPA: PRUEBAS DE VIABILIDAD Y FITOTOXICIDAD	- 13 -
2.4.1 RECOLECCIÓN DE AGUA DE RÍO Y CARACTERIZACIÓN	- 13 -
2.4.2 ENSAYO DE FITOTOXICIDAD CON VIGNA RADIATA	- 14 -
2.5 QUINTA ETAPA: IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA	- 16 -
2.5.1 REPIQUE POR ESTRÍAS EN SUPERFICIE	- 16 -
2.5.2 SECUENCIACIÓN MOLECULAR	- 16 -
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 17 -
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 17 -
3.1 PRIMERA ETAPA: SELECCIÓN DE UNA CEPA PARA EXPERIMENTOS POSTERIORES	17 -
3.1 SEGUNDA ETAPA: ESTUDIOS PRELIMINARES	- 18 -
3.1.1 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	- 18 -
3.1.2 TEMPERATURA Y pH	- 19 -
3.2 TERCERA ETAPA: BÚSQUEDA DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE BIODEGRADACIÓN	- 19 -
3.3 CUARTA ETAPA: PRUEBAS DE VIABILIDAD/FITOTOXICIDAD	- 24 -
3.3.1 EFICIENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN AÑADIENDO EL FACTOR AGUA DE RÍO	- 24 -
3.3.2 ENSAYO DE FITOTOXICIDAD	- 25 -

3.4	QUINTA ETAPA: IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA	- 28 -
4.	CONCLUSIONES	- 30 -
5.	BIBLIOGRAFÍA	- 31 -
6.	ANEXOS	- 36 -
6.1	Resultados crudos de la cuarta etapa “Búsqueda de condiciones óptimas para la biodegradación”. Resultados producto de medición GC-MS.	- 36 -
6.2	Resultados crudos de la quinta etapa “Pruebas de viabilidad”. Resultados producto de medición GC-MS.	- 37 -
6.3	Resultados crudos de la quinta etapa “Pruebas de fitotoxicidad”. Resultados producto de medición GC-MS.	- 37 -
6.4	Análisis estadístico – Supuestos del ANOVA para las distintas variables evaluadas.	- 39 -
6.5	Análisis estadístico cuarta etapa “Búsqueda de condiciones óptimas para la biodegradación” – Comparaciones – Análisis de la varianza paramétrica: Prueba de Tukey & Análisis de la varianza no paramétrica: Prueba de Kruskal Wallis.	- 44 -
6.6	Análisis estadístico quinta etapa “Pruebas de viabilidad/fitotoxicidad” – Comparaciones – Análisis de la varianza.	- 46 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Cultivos bacterianos aislados mediante estrías por agotamiento en superficie sobre medio LB sólido.	- 10 -
Figura 2:	(A): Compuesto químico P-Nitrofenol utilizado en los experimentos; (B): Cultivos en medio líquido LB con PNP (amarillo) y sin PNP (incoloro); (C): Lector de densidad óptica NanoQuant Plate™ marca TECAN; (D): Lugar de trabajo, campana de flujo laminar.	- 11 -
Figura 3:	Material para estudio de fitotoxicidad.	- 15 -
Figura 4:	(A): Placa de Elisa con cuadruplicados por muestra para el análisis de DO. ;(B): Muestras con acetona correspondiente a los tres tratamientos.	- 15 -
Figura 5:	Pasos para la siembra de bacterias por la técnica de agotamiento por estrías en superficie. Fuente: Dirección de bromatología de Neuquén, 2021.	- 16 -
Figura 6:	Media de la densidad óptica \pm DE a 600 nm para las 17 colonias bacterianas cultivadas (JT) por 48 h en caldo líquido LB suplementado con P-Nitrofenol (PNP).	- 17 -
Figura 7:	Densidad óptica a 600 nm de JT-2 a distintas concentraciones de PNP \pm desviación estándar. Dosis de inóculo de JT-2: 1% v/v. pH 7.	- 18 -
Figura 8:	Densidad óptica de la cepa bacteriana JT-2 a distintos niveles de pH (A) y temperaturas (B) luego de 24 h de incubación.	- 19 -
Figura 9:	Biodegradación de PNP bajo distintas concentraciones iniciales del mismo por efecto de la cepa bacteriana JT-2 en caldo LB líquido, dosis de inóculo: 1% v/v. Concentración residual de PNP media expresada en porcentaje \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas al realizar una comparación de medias de Tukey (día 1, 2 y 4) y Kruskal Wallis (día 3), $p < 0,05$. Condiciones experimentales: pH: 7; Temperatura: 30 °C; RPM: 150.	- 20 -

Figura 10: Biodegradación de PNP bajo distintos niveles de pH por efecto de la cepa bacteriana JT-2 en caldo LB líquido, dosis de inóculo: 1% v/v. Concentración residual de PNP media expresada en porcentaje \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas de análisis de la varianza con una comparación de medias de Tukey, $p < 0,05$. Condiciones experimentales: Concentración inicial de PNP: 100 mg L ⁻¹ ; Temperatura: 30°C; RPM: 150. _____	- 22 -
Figura 11: Biodegradación de PNP bajo distintas dosis de inóculo por efecto de la cepa bacteriana JT-2 en caldo LB líquido. Concentración residual de PNP media expresada en porcentaje \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas al realizar comparación de medias de Tukey, $p < 0,05$. Condiciones experimentales: Concentración inicial de PNP: 100 mg L ⁻¹ ; pH: 7; Temperatura: 30 °C; RPM: 150. _____	- 23 -
Figura 12: Biodegradación de PNP en agua de río artificialmente contaminada, inoculado con la cepa bacteriana JT-2 (dosis de inóculo: 3% v/v). Concentración residual de PNP media expresada en porcentaje \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas en la comparación de medias de Tukey, $p < 0,05$. Condiciones experimentales: Concentración inicial de PNP: 100 mg L ⁻¹ ; pH: 7; Temperatura: 30 °C; RPM: 150. _____	- 25 -
Figura 13: Media de longitud de radícula (A) y plúmula (B) en milímetros \pm desviación estándar, para los tres tratamientos (Control, Tratado y No Tratado) del ensayo de fitotoxicidad con Vigna radiata. Las letras indican diferencias significativas de medias bajo una prueba de Tukey, $p < 0,05$. Condiciones de incubación: luz indirecta, temperatura ambiente (≈ 25 °C) durante 7 días. _____	- 26 -
Figura 14: (A): Peso húmedo total en gramos de las plántulas de V. radiata (n=20) bajo los tratamientos: control, no tratado y tratado; (B): Vigna radiata en incubación luego de una semana de tratamiento. _____	- 27 -
Figura 15: Plántulas de Vigna Radiata regadas con: (A) agua corriente (control), (B) agua tratada, (C) agua sin tratar luego de una semana de tratamiento. _____	- 27 -
Figura 16: Árbol filogenético de la cepa bacteriana JT-2 construido en base a su identificación molecular. -	28 -
Figura 17: Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para la variable "Concentración inicial de PNP". $p < 0,05$. _____	- 39 -
Figura 18: Gráfico QQ-Plot de los residuos de la variable "Concentración inicial de PNP" para los 4 días analizados. _____	- 39 -
Figura 19: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de la variable "Concentración inicial de PNP". $p < 0,05$. _____	- 39 -
Figura 20: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Concentración inicial de PNP" particionado por día. _____	- 39 -
Figura 21: Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para la variable "Nivel de pH". $p < 0,05$. _____	- 40 -
Figura 22: Gráfico QQ-Plot de los residuos de la variable "Nivel de pH" para los cuatro días analizados. -	40 -
Figura 23: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de la variable "Nivel de pH". $p < 0,05$. _____	- 40 -
Figura 24: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Nivel de pH" particionado por día. _____	- 40 -
Figura 25 : Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para la variable "Dosis de inóculo". $p < 0,05$. _____	- 41 -
Figura 26: Gráfico QQ-Plot de los residuos de la variable "Dosis de inóculo" para los cuatro días analizados. -	41 -

Figura 27: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de la variable "Dosis de inóculo". $p < 0,05$.	- 41 -
Figura 28: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Dosis de inóculo" particionado por día.	- 41 -
Figura 29: Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para la variable "Agua de río". $p < 0,05$.	- 42 -
Figura 30: Gráfico QQ-Plot de los residuos de la variable "Agua de río" para los cuatro días analizados.	- 42 -
Figura 31: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de la variable "Agua de río". $p < 0,05$	- 42 -
Figura 32: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Agua de río" particionado por día.	- 42 -
Figura 33: Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para las variables "Longitud de plúmula" y "Longitud de radícula". $p < 0,05$.	- 43 -
Figura 34: Gráfico QQ-Plot de los residuos de las variables "Longitud de plúmula" y "Longitud de radícula".	- 43 -
Figura 35: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de las variables "Longitud de plúmula" y "Longitud de radícula". $p < 0,05$	- 43 -
Figura 36: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Longitud de radícula".	- 43 -
Figura 37: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Longitud de plúmula".	- 43 -
Figura 38: Análisis de la varianza: Prueba de Tukey $p < 0,05$. Variable evaluada: Concentración inicial de PNP para los días 1, 2 y 4.	- 44 -
Figura 39: Análisis de la varianza: Prueba de Kruskal Wallis. Variable evaluada: Concentración inicial de PNP para el día 3.	- 44 -
Figura 40: Análisis de la varianza: Prueba de Tukey $p < 0,05$. Variable evaluada: Nivel de pH.	- 45 -
Figura 41: Análisis de la varianza: Prueba de Tukey $p < 0,05$. Variable evaluada: Dosis de inóculo.	- 45 -
Figura 42: Análisis de la varianza: Prueba de Tukey $p < 0,05$. Variable evaluada: Efecto de matriz ambiental (Agua de río).	- 46 -
Figura 43: Análisis de la varianza no paramétrica: Prueba de Kruskal Wallis. Variable evaluada: Longitud de plúmula en ensayo de fitotoxicidad.	- 46 -
Figura 44: Análisis de la varianza no paramétrica: Prueba de Kruskal Wallis. Variable evaluada: Longitud de radícula en ensayo de fitotoxicidad.	- 46 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración de PNP en efluentes de diferentes industrias. Fuente: Recopilado de Alcaraz Fallas, 2009. _____	- 6 -
Tabla 2: Toxicidad de P-Nitrofenol para distintas especies acuáticas. Recopilado de EPA, 1980 (Ambient Water Quality Criteria for Nitrophenols). _____	- 7 -
Tabla 3: Toxicidad de PNP sobre especies de mamíferos. Recopilado de EPA, 1980. _____	- 7 -
Tabla 4: Resultados del análisis físico-químico de agua del río Sam-Ch'on, Jeonju-si, Corea del Sur. _____	- 24 -

ÍNDICE DE TABLAS EN ANEXO

Tabla A 1: Concentración residual de PNP en $\text{mg L}^{-1} \pm$ desviación estándar para el tratamiento de biodegradación por parte de la cepa JT-2 con distintas concentraciones iniciales de PNP durante 4 días de ensayo. _____	- 36 -
Tabla A 2: Concentración residual de PNP en $\text{mg L}^{-1} \pm$ desviación estándar para el tratamiento de biodegradación por parte de la cepa JT-2 con distintos niveles de pH durante 4 días de ensayo. _____	- 36 -
Tabla A 3: Concentración residual de PNP en $\text{mg L}^{-1} \pm$ desviación estándar para el tratamiento de biodegradación por parte de la cepa JT-2 con distintas dosis de inóculo durante 4 días de ensayo. _____	- 36 -
Tabla A 4: Concentración residual de PNP en $\text{mg L}^{-1} \pm$ desviación estándar para el tratamiento de biodegradación por parte de la cepa JT-2 con PNP diluido en agua de río durante cuatro días de ensayo. _	- 37 -
Tabla A 5: Resultados del ensayo de fitotoxicidad. Long. de plúmula y radícula (mm), peso húmedo (g) y germinación (%). $n=20$. _____	- 37 -
Tabla A 6: Prueba de supuestos de normalidad y homocedasticidad para las variables evaluadas. _____	- 39 -
Tabla A 7: Análisis de la varianza correspondiente a la cuarta etapa del estudio "Búsqueda de condiciones óptimas para la biodegradación". Prueba de Tukey y prueba de Kruskal Wallis. _____	- 44 -
Tabla A 8: Análisis de la varianza correspondiente a la quinta etapa del estudio "Pruebas de viabilidad/fitotoxicidad". Prueba de Tukey y Prueba de Kruskal Wallis. _____	- 46 -

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FUNDAMENTACIÓN

Según el informe mundial de las Naciones Unidas (2017), mundialmente, más del 80% de todas las aguas residuales municipales e industriales regresan al medio ambiente sin recibir tratamiento, mientras que 2000 millones de personas viven en países que sufren escasez de agua (UN, 2019). La actividad antrópica y la industrialización han producido impactos inusuales en el medio ambiente generando una gran cantidad de compuestos químicos tóxicos, como los xenobióticos (Mohan et al., 2022).

Los compuestos químicos que son catalogados como xenobióticos tienen como principales características que no existieron o rara vez lo hicieron como productos naturales y/o contienen estructuras o elementos que no pueden ser sintetizados bioquímicamente. En consecuencia, durante la evolución de enzimas catabólicas y vías de degradación, los organismos no estuvieron expuestos a estas estructuras y por ende en su mayoría no desarrollaron la capacidad de usar estos compuestos como fuente de carbono y energía (Rieger et al, 2002). Estos xenobióticos tienden a ser de naturaleza ubicua y forman parte de los componentes químicos de diversas industrias como productos farmacéuticos y productos de cuidado personal, tintes, pinturas, pesticidas, plásticos, polímeros, aditivos alimentarios y colorantes (Kucherenko et al., 2021; Yoo et al., 2022). En los últimos años, estos compuestos se han infiltrado en varios componentes bióticos y abióticos del ecosistema y representan una gran amenaza para la cadena alimenticia (Mohan et al., 2020). Con escasas rutas metabólicas que los degrade, la mayoría de ellos pueden alcanzar concentraciones tóxicas que causan efectos perjudiciales cada vez mayores sobre los seres vivos (Croom, 2012).

Entre estos xenobióticos, se encuentran los nitrofenoles, de los cuales existen 3 tipos sintetizados industrialmente: 2-nitrofenol, 3-nitrofenol y 4-nitrofenol. El 2-nitrofenol se usa principalmente para manufacturar tinturas, pigmentos, productos de caucho y sustancias fungicidas, mientras que al 3-nitrofenol se le da un uso analítico y de laboratorio (Alcaraz Fallas, 2009). Durante la producción de un tipo de nitrofenol, suele producirse una cierta cantidad de su isómero, por lo que generalmente se les considera en conjunto cuando se discuten sus propiedades y efectos perjudiciales. El P-Nitrofenol (también conocido como PNP, 4-nitrofenol o 4-NP), es el mononitrofenol más importante en términos de cantidades producidas y como potencial contaminante ambiental (E. W. group, 1980). Se usa ampliamente en la fabricación de fármacos, colorantes sintéticos, productos petroquímicos, pesticidas, explosivos y en el tratamiento del cuero (Sreeja Mole et al, 2021).

Los nitrofenoles son sustancias tóxicas y están catalogadas como peligrosas. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, EPA, enumera el P-Nitrofenol como contaminante prioritario y restringe sus concentraciones en aguas naturales a $<10 \text{ ng L}^{-1}$ (Suja et al., 2012). No obstante, la máxima concentración recomendada en agua potable es de $60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (EPA,

2015). A pesar de esto, durante las últimas décadas, se ha comprobado que, aunque la mayoría de las personas se encuentran expuestas a nitrofenoles, debido a su baja concentración, no evidencian efectos adversos (Peña Martínez, 2014). La Agencia de Protección para el Medioambiente de EE. UU. ha detectado en al menos 14 de 1177 zonas industriales, la presencia de nitrofenoles dentro de un rango significativo (Ruiz Muñoz, 2010).

Las principales vías de exposición a este compuesto son mediante inhalación de aire contaminado, especialmente durante derrames; e ingiriendo agua contaminada cerca de áreas agrícolas donde se han aplicado ciertos fungicidas o cerca de sitios de desechos peligrosos y vertederos (Alcaraz Fallas, 2009). La exposición a PNP a menudo puede provocar irritación de la piel y los ojos, daño renal, mal funcionamiento del hígado, envenenamiento sistemático e incluso puede actuar como un poderoso agente cancerígeno (Sreeja Mole et al, 2021). El contacto prolongado puede causar severa irritación y quemaduras (Alcaraz Fallas, 2009). La absorción interna al cuerpo origina la formación de metahemoglobina la cual en concentraciones suficientes causa cianosis. Los efectos pueden ocurrir de 2 a 4 horas (Alcaraz Fallas, 2009). La acumulación de PNP, como uno de los xenobióticos disruptores endocrinos, en el aire (Nishioka et al., 1992), el suelo y el agua (Asman et al., 2005) podría tener profundos efectos nocivos en la salud de los seres humanos, el ganado y la vida silvestre a través de una alteración de los sistemas endocrino y reproductivo (Ahmed et al. 2015). Cabe mencionar que no se han realizado estudios en humanos, el conocimiento de sus efectos es de origen empírico.

A pesar de que no hay estudios que hayan evaluado los efectos de los nitrofenoles sobre los seres humanos, investigaciones con animales han demostrado que el PNP puede producir enfermedades de la sangre (Alcaraz Fallas, 2009) y gran afectación de órganos reproductivos (Ahmed et al., 2015). Un estudio realizado con *Coturnix japónica* (Codornís japonesa) donde se les administró dosis diarias de PNP (0, 0,01, 0,1 y 1 mg kg⁻¹ de masa corporal) demostró que la exposición a largo plazo a este xenobiótico causa cambios histopatológicos testiculares como la vacuolación de células espermatogénicas y espermatocitos con atrofia significativa de las glándulas testiculares y cloacales. Además, los animales mostraron una disminución sustancial de las concentraciones de hormonas luteinizante (LH) y testosterona luego de 2 meses de tratamiento (Ahmed et al., 2015).

Numerosas investigaciones demuestran la presencia de PNP en la cotidianidad de las personas. Mundialmente, se han detectado nitrofenoles en el aire (resultado de reacciones fotoquímicas atmosféricas), aunque la mayor parte se deposita en el agua y en el suelo, identificándose en las aguas de lluvia, en efluentes de aguas residuales de varias industrias y en el agua potable (Alcaraz Fallas, 2009). En un estudio realizado en la universidad de Santiago de Chile en el año 2010, se demostró la presencia de P-Nitrofenol en muestras de rocío, con un promedio de 0,03 mg L⁻¹ de un total de 22 muestras (Fuentes Jorquera, 2012).

Asimismo, el PNP es un producto de degradación de los pesticidas Paration y Metilparation, a los cuales se encuentran expuestos numerosos trabajadores rurales (Kubota, 2000). Inclusive, la medición de este compuesto en orina es un método utilizado como indicador a la exposición de estos pesticidas (Quinto, 2006). En un estudio realizado en 1980, el PNP fue detectado en la orina del 1% de la población civil con niveles tan altos como $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, con una media de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Asumiendo que los residuos urinarios de PNP reflejan directamente la exposición de la persona a este compuesto, se puede hacer una estimación farmacocinética de la exposición basada en condiciones de estado estacionario (E.w. group, 1980). El nivel de exposición acorde con el nivel de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de residuo de PNP en orina puede ser calculado dando como resultado una exposición diaria de $0,02 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ de masa corporal. Un cálculo similar puede realizarse utilizando el máximo residuo de P-Nitrofenol observado ($113 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) dando un nivel de exposición de $2,26 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Sin embargo, estos resultados pueden no ser debido a exposición directa de PNP. Como se mencionó anteriormente, un gran número de pesticidas incluyendo paration y metilparation, son metabolizados a PNP en el cuerpo humano y pueden ser la fuente de este en su orina (E.w. group, 1980).

El pesticida Metil-parathion (MP), se lanzó en 1952 principalmente para controlar gorgojos en algodón y años después (1994 en adelante) fue ampliamente utilizado ilegalmente en varias partes de los Estados Unidos para el control de cucarachas en viviendas. Esto trajo graves problemas en la salud de los residentes. Un estudio realizado por Barr et al. (2002), midió la concentración de PNP en orina de los habitantes de las casas contaminadas con MP, como un producto de degradación directo del mismo. Se tomaron 16000 muestras y se descubrió que el 57% de estas contenía PNP en niveles detectables, la concentración media en la orina fue de 75 mg L^{-1} , muy por encima de la mencionada en el estudio anterior. El gobierno de los Estados Unidos ha invertido más de 75 millones de dólares en relocalización y desinfección de las casas afectadas (Barr et al., 2002). Desde 1993, en Argentina, la resolución 606/93 declara la prohibición de este pesticida junto con Etil-parathion tanto en su fabricación, importación y comercialización. El uso de Parathion está prohibido en Japón y Suecia desde 1971 y en Alemania desde 1980, entre otros países. En Noruega desde 1983 el uso de este principio activo exige una licencia especial y en la USA su uso está regulado desde 1975 por la Agencia de Protección Ambiental (Gallo, 2006). Por su parte en Corea del Sur, el uso de este pesticida no está prohibido, pero sí regulado por el "Water Environment Conservation Act (WECA)" desde 1990.

Afortunadamente, los microorganismos actúan como una herramienta importante en la eliminación de estos contaminantes tóxicos mediante el proceso denominado biodegradación. Muchos microorganismos tienen la capacidad de degradar, remover, alterar, inmovilizar o desintoxicar diversos desechos físicos y químicos del medio ambiente y transformarlos en formas más simples que son compuestos menos dañinos o no tóxicos (Mohan et al., 2020).

Esta capacidad de los microbios para utilizar estos compuestos orgánicos como fuente de energía se ve facilitada por reacciones enzimáticas y vías bioquímicas que dependen del contaminante que encuentren (Abatenh et al., 2017). Debido a su bajo costo al momento de aplicación comparado con otros métodos y, además, causando mínima o nula destrucción a la flora y fauna autóctonas, se ha considerado que la biodegradación tiene una ventaja destacada sobre cualquier método de degradación físico-químico (Olaniran et al., 2013). Sin embargo, hay que considerar la precaución necesaria al utilizar especies alóctonas, especialmente si los tratamientos se realizan en sistemas abiertos, ya que se podrían provocar invasiones biológicas (Blackburn et al., 2011).

El vertido al medio ambiente de contaminantes por parte de la industria ha obligado a profundizar en estudios sobre su degradación. Debido a la amplia presencia de PNP en el entorno y los potenciales impactos negativos que produce, es que se considera necesario utilizar tecnologías sostenibles para disminuir este tipo de compuesto del ambiente, y de esta manera reducir sus efectos nocivos sobre los ecosistemas y las formas de vida que allí habitan. La biodegradación es una tecnología con mucho potencial y relativamente poco aplicada en la actualidad en el tratamiento de efluentes industriales, por lo que se supone primordial aumentar los estudios en esta área. Por lo tanto, en el presente trabajo, tuvo como objetivo (i) seleccionar una cepa bacteriana de lodos de desechos de granjas porcinas capaz de degradar PNP, (ii) optimizar los parámetros experimentales sobre la degradación del xenobiótico y (iii) evaluar la fitotoxicidad de la muestra remediada y su extensión sobre efluente real.

1.2 HIPÓTESIS

De un total inicial de 17 cepas bacterianas previamente aisladas, al menos una es capaz de biodegradar el compuesto orgánico P-Nitrofenol, de manera de obtener un tratado de baja toxicidad.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Disminuir la toxicidad de un medio líquido contaminado con P-Nitrofenol mediante la selección de una cepa bacteriana capaz de metabolizarlo y la optimización de las condiciones de laboratorio.

1.3.2 Objetivos específicos

- Seleccionar una cepa bacteriana capaz de tolerar elevadas concentraciones de PNP (bioinhibitorias).
- Caracterizar la biodegradación de PNP a concentraciones seriadas del mismo, niveles de pH y dosis de inóculo.
- Seleccionar la concentración inicial de PNP, dosis de inóculo y pH donde la biodegradación por parte de la bacteria sea óptima.

- Determinar la biodegradación del PNP en una matriz ambiental (agua de río).
- Determinar la eficacia de la biodegradación de PNP mediante ensayos de fitotoxicidad.
- Identificar mediante técnicas moleculares la cepa seleccionada.

1.4 MARCO TEÓRICO

Existen ciertos compuestos que son considerados como xenobióticos, estos son aquellos productos orgánicos de origen antrópico que poseen estructuras moleculares diferentes a sustratos naturales, o los intermediarios metabólicos a los que están adaptados los microorganismos. Esto provoca que la mayoría de las enzimas encargadas de degradarlos no los reconozcan y tiendan a acumularse en el medio ambiente (Chong et al., 2012). El concepto de xenobiótico puede aplicarse también a compuestos orgánicos que son liberados al medio ambiente por acción del humano, de manera que se encuentren en concentraciones más altas a las naturales (Singleton, 1994), estos compuestos pueden entrar al medio ambiente directa o indirectamente contaminándolo (Carrillo Pérez et al., 2011). Es así como ciertos grupos de sustituyentes de compuestos sintéticos tales como: halógenos, sulfo, nitro o compuestos fenólicos se acumulan y adquieren el carácter de xenobiótico (Knackmuss, 1996).

Un ejemplo de xenobiótico ampliamente utilizado es el P-Nitrofenol, 4-Nitrofenol o PNP, el cual es un compuesto orgánico fenólico, ya que posee un anillo de benceno unido a un grupo hidroxilo. La letra "P" significa "Para", e indica que sus radicales están ubicados en la posición 1 y 4 del anillo bencénico. Los grupos presentes son hidroxilo en la posición 1 y grupo nitro en la posición 4. La fórmula química del PNP es $C_6H_5NO_3$, se trata de una sustancia sintética, es decir, producida antrópicamente. Se caracteriza por ser un polvo cristalino de color blanco-amarillento. Este posee una masa molecular de $139,11 \text{ g mol}^{-1}$, su punto de ebullición es de $279 \text{ }^\circ\text{C}$, su punto de fusión es de $110\text{-}115 \text{ }^\circ\text{C}$, también es importante destacar que no se volatiliza a temperatura ambiente. Es soluble en agua hasta 16 g L^{-1} , también solubiliza en etanol, cloroformo y dietileter (Gil, 2019).

Entre sus numerosos usos se mencionan los siguientes: como indicador de pH ya que se torna incoloro a pH por debajo de 5,4, aunque no es muy utilizado para este fin; es también ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, por ejemplo para sintetizar acetaminofén o paracetamol, el cual es uno de los analgésicos más empleados en la actualidad; por otro lado es utilizado como materia prima para la elaboración de tinturas, usadas para oscurecer el cuero; también en la síntesis de ciertos fungicidas y pesticidas como paration o metilparation (Gil, 2019). Otra fuente importante de contaminación con PNP es durante la fabricación de productos petroquímicos, refinamiento de aceites, caucho, operaciones de preservación de madera, producción de pesticidas, pinturas, pulpa de papel y plásticos (Álvarez Torrellas et al., 2017).

Los mononitrofenoles tienen tres formas isoméricas, que se diferencian por la posición del grupo nitro en el anillo fenólico. Las tres formas posibles son el 2-Nitrofenol (O-Nitrofenol), el 3-Nitrofenol (M-Nitrofenol) y el 4-Nitrofenol (P-Nitrofenol). La síntesis comercial de 2-Nitrofenol y 4-Nitrofenol es realizada por medio de un hidrolisis del cloronitrobenzeno isómero apropiado con hidróxido de sodio acuoso a elevadas temperaturas (Howard et al., 1976). Debido al uso que se les da, la mayor fuente de contaminación de estos compuestos es de plantas de producción y empresas químicas donde estos compuestos son usados como intermediarios. La demanda mundial de este producto era de 16.000 toneladas en 1976 y las proyecciones indicaban un crecimiento de la misma. La mayoría de PNP producido (87%) era utilizado en la fabricación de los pesticidas etil y metil-paration (E.w. group, 1980). La tabla 1 resume la concentración de P-Nitrofenol en efluentes de distintas industrias (Alcaraz Fallas, 2009).

Tabla 1: Concentración de PNP en efluentes de diferentes industrias. Fuente: Recopilado de Alcaraz Fallas, 2009.

Industria	Concentración de P-Nitrofenol mg L⁻¹
Productos químicos orgánicos / plásticos	<190
Textil	<10
Acabado de metales	<10

Existen múltiples concentraciones límites permitidas de P-Nitrofenol tanto para deposición como para agua de consumo, incluso hay países que no lo tienen en cuenta en sus normativas. El límite de PNP para agua potable establecidos por en la U.S.S.R. es de 0,02 mg L⁻¹ (Stöfen, 1973). Dentro de la unión europea, no existe una normativa vigente sobre la eliminación de los nitrofenoles, quedando sujeto su tratamiento y eliminación a los reglamentos internos de cada país (Ruiz Muñoz, 2010). En México, el límite permitido de fenoles y compuestos fenólicos en agua potable es de 0,001 mg L⁻¹, aunque esta norma no considera al PNP en particular (NOM-127-SSA1-1994). Por otro lado, la Ley Nacional Argentina de Residuos Peligrosos N° 24.051 y su decreto reglamentario considera que el límite máximo de fenoles totales en lixiviados es de 0,1 mg L⁻¹, por lo cual un residuo que presente una concentración superior es considerado peligroso y debe gestionarse siguiendo los mecanismos de control técnicos y administrativos pertinentes. Sin embargo, Argentina no ha considerado en ninguna de sus leyes al compuesto PNP en particular.

La biotoxicidad del compuesto P-Nitrofenol fue puesta en valor en un informe realizado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), llamado “Ambient Water Quality Criteria for Nitrophenols”, en él se detallan los criterios de calidad de agua para Nitrofenoles. (EPA, 1980). En este informe se muestra como distintas dosis de PNP, pueden afectar variadas especies de agua dulce y salada. En la [tabla 2](#), se observa una recopilación de datos extraídos de este documento, puede observarse que a partir de una dosis de

aproximadamente $4 \mu\text{g L}^{-1}$, el compuesto comienza a tener efectos inhibitorios para la vida. CL50 (concentración letal 50) representa la concentración de una sustancia que causa el 50% de letalidad de una población acuática estudiada. A grandes rasgos, puede notarse que en especies de agua dulce tienden a ser más sensibles a este compuesto que aquellas de agua salada como *Crangon septemspinosa* o *Cyprinodon variegatus*, cuyo LC50 es mayor a $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 2: Toxicidad de P-Nitrofenol para distintas especies acuáticas. Recopilado de EPA, 1980 (Ambient Water Quality Criteria for Nitrophenols).

Especie	Detalle	Dosis de PNP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto	Tiempo de exposición
<i>Lepomis macrochirus</i>	Pez de agua dulce	8,28	LC50	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alga unicelular de agua dulce	6,95	LC50	-
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alga unicelular de agua dulce	4,19	LC50	-
<i>Mysidopsis bahia</i>	Crustaceo estuarino	7,17	LC50	-
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Pez marino	27,1	LC50	-
<i>Skeletonema costatum</i>	Alga de agua marina	7,37	LC50	-
<i>Carassius auratus</i>	Pez marino	8	42% mortalidad	8 h
<i>Crangon septemspinosa</i>	Camarón de agua marina	26,4	valor umbral letal	96 h
<i>Mya arenaria</i>	Almeja marina	29,4	valor umbral letal	96 h

En el mismo informe, (EPA, 1980) se realiza una recopilación de estudios anteriores, donde se realizaron experimentos con mamíferos para ver el efecto del P-Nitrofenol en los mismos. En la tabla 3 pueden observarse los resultados de estudios de distintos autores, donde se detalla en las primeras 4 filas, la mínima dosis que fue necesaria para lograr la letalidad de las especies bajo estudio y en las últimas tres filas, aquella que lograra la muerte del 50% de la población estudiada (LD50). Puede observarse que especies como perro o rana, son extensamente más sensibles que otras como el conejo o la rata.

Tabla 3: Toxicidad de PNP sobre especies de mamíferos. Recopilado de EPA, 1980.

ESPECIE	Dosis (mg/Kg)	Efecto	Fuente
Rana	50	Mínima dosis letal	Spector, 1956
Conejo	600	Mínima dosis letal	Spector, 1956

Gato	197	Mínima dosis letal	Spector, 1956
Perro	10	Mínima dosis letal	Spector, 1956
Rata	620	LD50	Vernot, et al. 1997
Ratón	470	LD50	Vernot, et al. 1997
Rata	350	LD50	Fairchild, 1977

Existe un gran número de estudios precedentes donde se buscó la manera de disminuir la concentración de P-Nitrofenol en soluciones acuosas a través de métodos físicos, químicos, biológicos o la combinación de los anteriores. A continuación, se mencionan algunas de estas investigaciones.

Se ha trabajado con tratamientos **físicos** donde se realizó la absorción de P-Nitrofenol por el anión-cación de la paligorskita modificada, logrando una máxima capacidad de absorción de $137,74 \text{ mg g}^{-1}$ (Chang et al., 2009). En otro estudio se realizó la degradación de P-Nitrofenol en biochar (biocarbón). En este se demostró que la degradación de PNP a través del contacto directo con partículas de biochar podría contribuir de manera importante a la reducción de la concentración del mismo en fase acuosa. (Yang et al., 2016). Por último, se estudió la irradiación ultrasónica de PNP en solución acuosa (Kotronarou et al., 1991).

También se ha experimentado la degradación del xenobiótico mediante métodos **químicos**, primeramente, se estudió la degradación fotocatalítica del PNP en partículas nanométricas de dióxido de titanio con ácido 5-sulfosalicílico (Li et al., 2005). Asimismo, otra investigación demuestra la reducción de P-Nitrofenol a P-Aminofenol sobre nanopartículas de Au depositadas sobre polimetacrilato de metilo (Kuroda et al., 2009). Además, mediante un sistema mFe/Cu-aire-PS en solución acuosa, se realizaron experimentos por lotes para investigar el rendimiento del sistema de persulfato de aire y partículas bimetálicas de Fe/Cu a microescala (mFe/Cu-aire-PS) para el tratamiento de PNP (Zhang et al., 2019). Por último, mediante activación heterogénea asistida por microondas de peroximonosulfato por ferrita de manganeso; donde microondas actuaron como asistente para mejorar la eficiencia de degradación de PNP en la oxidación catalítica de peroximonosulfato (PMS) activado con MnFe_2O_4 (Pang et al., 2016).

Existe amplia evidencia del uso de métodos **biológicos** para la biodegradación de contaminantes, esta se define como aquellos sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros), para remover, degradar o transformar compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos de menor toxicidad o inocuos (Van Deuren et al, 1997). Esta capacidad de los microorganismos para utilizar este tipo de sustancias orgánicas como fuente de energía, mediante reacciones enzimáticas y vías bioquímicas, dependen del contaminante que encuentren (Abatenh et al, 2017). Un ejemplo fue el biotratamiento de P-Nitrofenol y

Nitrobenceno de aguas residuales realizado por Hu et al. (2008), donde se logró degradar el PNP en 60 horas. En otra publicación se muestran procesos simultáneos de generación de electricidad y degradación de PNP en una célula de combustible microbiana, en el cual se logró degradar completamente el xenobiótico en 12 horas (Zhu et al., 2009). Por último, se trabajó con consorcios de microorganismos en la forma de gránulos microbianos a partir de lodos activados y gránulos pre-establecidos en fuentes de carbono lábil, donde se logró biodegradar eficazmente PNP en concentraciones iniciales menores a 50 mg L^{-1} (Suja et al., 2012).

Por excelencia, los microorganismos han sido los principales descomponedores de compuestos orgánicos en el ambiente, tanto en el suelo y agua como también en el sistema digestivo de animales. Estos establecen relaciones entre sí de formas variadas y complejas, y juegan un rol fundamental en los ciclos biogeoquímicos de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y demás metales, son primordiales para la fertilidad del suelo y la protección de las plantas y animales frente a patógenos. Además, y de gran interés en este estudio, algunos tienen la excepcional capacidad de biodegradar compuestos xenobióticos (Salazar et al., 2014). En este estudio, se investigó la capacidad de biodegradación del compuesto xenobiótico P-Nitrofenol en los residuos de una granja porcina, teniendo en cuenta la potencial presencia de este contaminante en este sitio. Para ello, se procedió al aislamiento de bacterias específicas que posteriormente fueron utilizadas en los experimentos subsiguientes.

Para evaluar la eficiencia de biodegradación, es muy común la aplicación de ensayos de fitotoxicidad. El porcentaje de germinación y los ensayos de crecimiento son las técnicas más utilizadas para evaluar la fitotoxicidad (Degli-Innocenti et al., 2001). El uso de plantas vasculares en este tipo de estudios se ha remitido principalmente a la evaluación de efectos tóxicos, genotóxicos y estudios de exposición en ecosistemas terrestres, en especial considerando el daño en cultivos y especies de interés agronómico (Sobrero, 2010). Las especies vegetales presentan diferente sensibilidad frente a los distintos contaminantes debido a sus variadas características biológicas, fisiología, morfología, estructura, hábitat y rol ecológico, además de la variación asociada a las diferentes vías de exposición a los tóxicos (contacto directo, a través del agua o suelo) y estado ontogenético durante la exposición (semilla, plántula, planta) (Boutin et al., 1993; Mohan y Hosetti, 1999). Sin embargo, es importante tener en cuenta que no es posible establecer patrones generales de respuesta a un compuesto tóxico en particular por parte de un organismo, por lo que no sería correcto extrapolar la información obtenida en ensayos de fitotoxicidad, a animales, bacterias, hongos e incluso otras especies vegetales (Sobrero, 2010).

Plantas del género *Vigna*, de la familia de las leguminosas, han sido utilizadas ampliamente en ensayos de fitotoxicidad. Nisha et al. (2008) estudiaron el crecimiento de *V. radiata* (poroto

mung) al añadir concentraciones crecientes de mercurio al agua de riego, con el objetivo de establecer límites regulatorios del metal pesado. En otro estudio realizado por Zimicz et al. (2019) se evaluó como concentraciones crecientes de boro afectaban el desarrollo temprano de *V. radiata*. Mohan et al. (2020), utilizaron *Vigna mungo* (o *Phaseolus mungo*) para determinar la eficiencia de biodegradación de bisphenol A por parte de una cepa bacteriana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PRIMERA ETAPA: SELECCIÓN DE UNA CEPA RESISTENTE A PNP

Todos los compuestos químicos utilizados incluyendo el P-Nitrofenol fueron provistos por *Kanto Chemical CO. INC.* (Japón) y fueron usados sin purificación alguna.

Se utilizaron 17 cepas bacterianas con potencial de biodegradación de PNP, las mismas fueron previamente aisladas, purificadas y caracterizadas por su crecimiento a distintas condiciones de pH y temperatura a partir de residuos de una granja porcina ubicada entre los departamentos de Iksan y Jeonju, Corea del Sur por la doctora [Sathya](#) (Figura 1) y almacenadas a 4 °C.

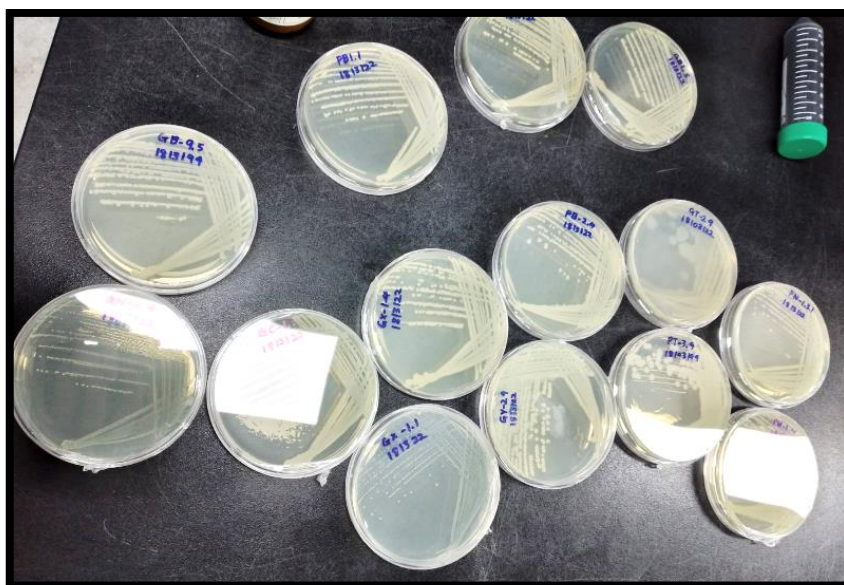


Figura 1: Cultivos bacterianos aislados mediante estrías por agotamiento en superficie sobre medio LB sólido.

Por otro lado, se realizó una dilución de PNP (Figura 2-A) en agua destilada estéril al 1%. Posteriormente, 0,2 mL de esta solución se colocaron en 10 mL de caldo líquido LB dentro de tubos plásticos de 15 mL de capacidad, resultando en una solución de 200 mg L⁻¹ de concentración del xenobiótico. Luego, se inocularon cada una de las 17 cepas bacterianas en los tubos mencionados, tanto en presencia (200 mg L⁻¹), como ausencia (control) del xenobiótico (Figura 2-B). Luego se llevaron a incubación por 24 h a 30 °C y 150 rpm. Se trabajó en condiciones asépticas bajo campana de flujo laminar (Figura 2-D).

Posteriormente, se midió la densidad óptica a 600 nm de las muestras incubadas en el lector de microplaca TECAN NanoQuant Plate™ (Figura 2-C). Para cuantificar el crecimiento bacteriano, se tomó una alícuota de 150 µL por cuadruplicado de cada muestra, y se trasvasó en una placa de Elisa que luego fue ingresada en el lector. Se seleccionó la cepa que presentó el máximo crecimiento en presencia del xenobiótico para continuar con los experimentos posteriores.

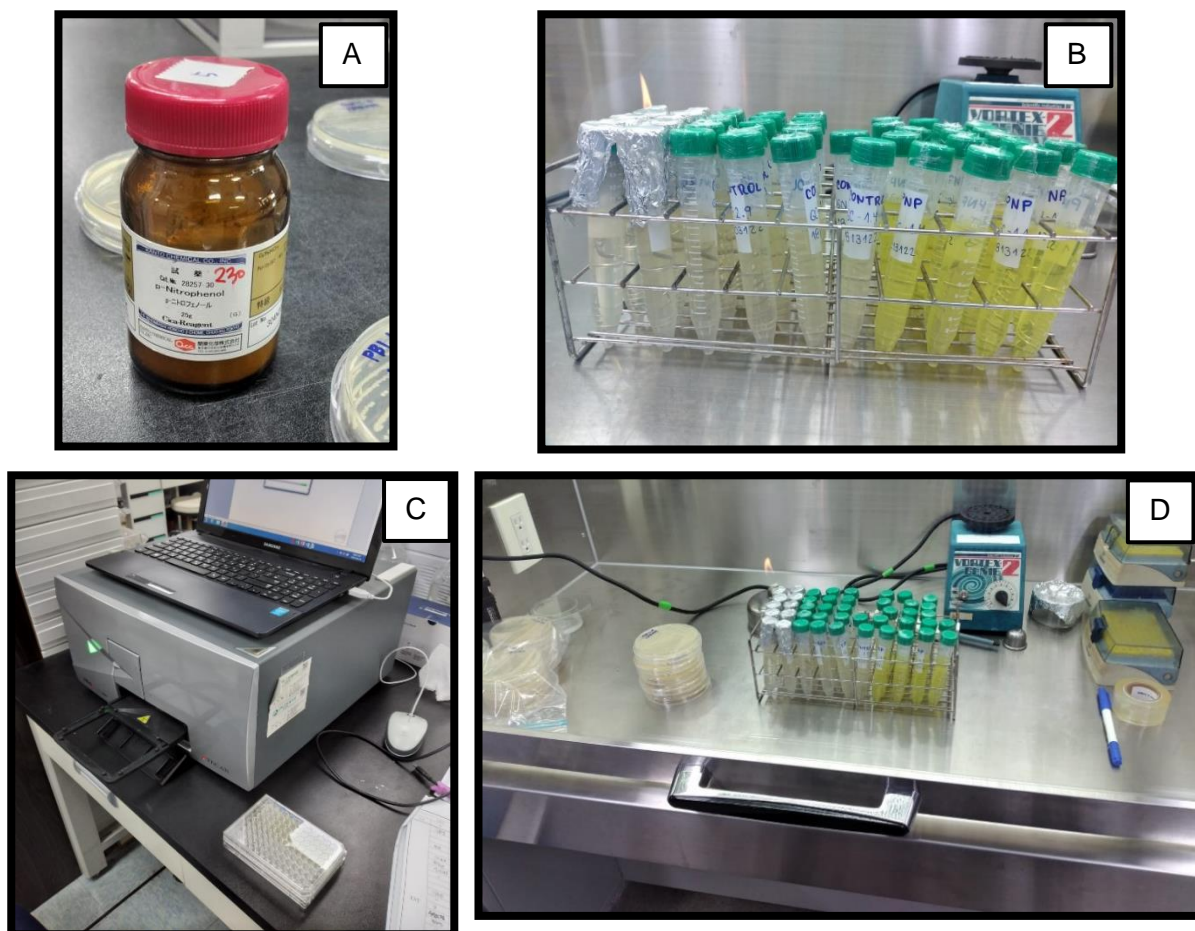


Figura 2: (A): Compuesto químico P-Nitrofenol utilizado en los experimentos; (B): Cultivos en medio líquido LB con PNP (amarillo) y sin PNP (incoloro); (C): Lector de densidad óptica NanoQuant Plate™ marca TECAN; (D): Lugar de trabajo, campana de flujo laminar.

2.2 SEGUNDA ETAPA: ESTUDIOS PRELIMINARES

Para conocer las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa seleccionada, se evaluó la temperatura, pH y dosis de P-Nitrofenol mínima inhibitoria. En el caso **temperatura** y **pH** óptimos, se efectuó la recopilación bibliográfica de la información.

En relación a la **mínima dosis inhibitoria de PNP**, se cultivó la bacteria seleccionada durante 48 h en tubos plásticos de 10 mL de caldo LB con las siguientes concentraciones del contaminante: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mg L⁻¹. Luego se midió la densidad óptica a 600 nm en el lector NanoQuant Plate™ (Figura 2-C) para evaluar el crecimiento de la bacteria. Por cuadruplicado, muestras de 150 µL fueron tomadas de cada concentración y colocadas en una

placa de Elisa con ayuda de una pipeta automática. Un estudio realizado por Inglezakis et al. (2017) demostraron que la concentración media inhibitoria de PNP para un lodo activado se halló entre 30 y 70 mg L⁻¹.

2.3 TERCERA ETAPA: BÚSQUEDA DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE BIODEGRADACIÓN

Con el objetivo de hallar las condiciones óptimas para la biodegradación, se realizaron experimentos monofactoriales de 4 días de duración, donde una de las condiciones (pH/dosis de inóculo/concentración inicial de PNP) se modificó mientras las demás permanecieron constantes para encontrar el valor óptimo de cada una. El cultivo permaneció en la incubadora a 150 rpm y 30 °C donde muestras diarias de 200 µL se tomaron y colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C y pasado el período experimental, la biodegradación del compuesto fue evaluada con el método GC-MS (Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas) y HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia).

2.3.1 ANÁLISIS QUÍMICO DE BIODEGRADACIÓN DE PNP

Para llevar una evaluación periódica de la biodegradación del PNP bajo los distintos tratamientos, las muestras se extrajeron diariamente y se filtraron con un filtro de jeringa de 0,22 µm para eliminar las bacterias y los desechos, para la detección de PNP se midió la concentración residual bajo el método GC-MS [Agilent 6890 N; Columna: DB-5MS (0,25 µm × 30 m × 0,250 mm); Detector: Detector de ionización de llama; Gas portador: He]. Por otro lado, las muestras se analizaron con HPLC (Shimadzu, detector UV, columna ECOSIL C18, 4,6 mm × 250 mm, 5 µm) para identificar los intermediarios producidos durante el proceso de biodegradación. Como resultado se obtuvieron cromatogramas donde se observó la cantidad relativa de moléculas de distintos pesos moleculares en cada día del tratamiento. Los resultados para cada tratamiento fueron graficados y pueden ser observados en la [sección 4](#).

2.3.2 CONDICIONES EVALUADAS

2.3.2.1 CONCENTRACIÓN INICIAL DE PNP

Para evaluar la mínima concentración de PNP inhibitoria para la cepa bacteriana seleccionada en la etapa 1, se la cultivó por triplicado en tubos de 15 mL con 10 mL de caldo líquido LB (dosis de inóculo 1% v/v, pH 7) con concentraciones seriadas de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mg L⁻¹ del xenobiótico y se incubaron a 30 °C y 150 rpm. Durante 4 días, muestras diarias de 200 µL fueron tomadas y almacenadas a 4 °C hasta finalizar el experimento para obtener la biodegradación periódica de PNP bajo los métodos GC-MS y HPLC. Luo et al. (2021) bioelectrodegradaron el contaminante comenzando con una solución de 50 mg L⁻¹. En otra investigación donde se analizó la biodegradación de PNP por parte de *Achromobacter*

denitrificans, se observó la máxima degradación bajo una concentración inicial de 200 mg L⁻¹ (Vijayan et al., 2021).

2.3.2.2 pH

Con el objetivo de estudiar el efecto del pH sobre la biodegradación de PNP por parte de la cepa bacteriana, se modificó el pH del caldo de cultivo previo a la inoculación de la misma. En primer lugar se tomaron 4 tubos plásticos de 15 mL con 10 mL de caldo de cultivo LB (tantos como niveles de pH requeridos), luego se procedió a medir el pH con el pHmetro OHAUS STARTER™ 2200, y posteriormente se adicionó H₂SO₄ o NaOH en pequeñas dosis con ayuda de una pipeta automática para alcanzar los valores de pH necesarios. Las mezclas se aunaron en Voltrex y se midieron los niveles de pH. El procedimiento se repitió las veces necesarias agregando nuevamente H₂SO₄ o NaOH hasta lograr el pH objetivo. Las cantidades del compuesto totales añadidas fueron cuantificadas para luego repetir el proceso en condiciones asépticas bajo campana de flujo laminar, ya sabiendo que cantidad justa de sustancia necesaria para alcanzar el pH objetivo (3, 5, 9 y 11) en los tubos de caldo LB. Una vez logrados los niveles de pH requeridos, PNP fue añadido en la concentración “óptima” resultante de la etapa anterior, luego los tubos fueron inoculados con la cepa bacteriana en dosis de 1% v/v. Finalmente, se procedió a colocar los tubos en incubadora a 30 °C y 150 rpm, donde muestras diarias de 200 µL fueron tomadas y almacenadas a 4 °C hasta finalizar el experimento para obtener la biodegradación periódica de PNP por el método GC-MS y HPLC.

2.3.2.3 DOSIS DE INÓCULO

Para evaluar el efecto de la dosis de inóculo sobre la biodegradación de PNP, la cepa seleccionada fue cultivada en caldo líquido LB con 1, 3 y 5% v/v de inóculo (el cual era cultivado el día anterior en caldo LB en ausencia del xenobiótico a 30 °C y 150 rpm). Las condiciones de pH y concentración inicial de PNP utilizadas fueron aquellas seleccionadas como óptimas en los experimentos anteriores. Durante 5 días, muestras de 200 µL fueron tomadas diariamente para obtener la biodegradación gradual diaria por los métodos GC-MS y HPLC. De esta manera se pudo comprobar la dosis de inóculo más favorable, considerando al inóculo como un recurso limitado.

2.4 CUARTA ETAPA: PRUEBAS DE VIABILIDAD Y FITOTOXICIDAD

2.4.1 RECOLECCIÓN DE AGUA DE RÍO Y CARACTERIZACIÓN

La eficiencia de degradación de PNP por la cepa bacteriana seleccionada en condiciones próximas a la realidad es imprescindible para evaluar su viabilidad a campo. Una muestra de agua fue recolectada del río Sam-Ch'on en Jeonju-si, Corea del Sur (35.843688, 127.105063), se filtró con una serie de mallas para eliminar los desechos físicos y se realizó su caracterización físico-química. Luego se le adicionó PNP artificialmente para crear una

solución al 1%, esta solución se añadió a los caldos de cultivo hasta lograr la concentración correcta (resultado de la etapa tres). Posteriormente, el caldo fue preparado con nivel de pH óptimo resultado de la etapa anterior. Por último, cada muestra fue inoculada con la dosis seleccionada y se determinó el porcentaje de degradación durante cuatro días de incubación utilizando los métodos GC-MS y HPLC para finalmente poder evaluar la influencia del agua de río en la biodegradación de PNP por parte de la cepa bacteriana.

2.4.2 ENSAYO DE FITOTOXICIDAD CON VIGNA RADIATA

Semillas de *Vigna radiata* fueron esterilizadas superficialmente con luz ultravioleta durante 10 minutos. Seguidamente, estas fueron colocadas en placas de Petri de 15 cm de diámetro con 2 capas de papel de filtro estéril y cubiertas con otra capa del mismo material (Figura 3). Tres tratamientos fueron llevados a cabo, el estudio se realizó por duplicado con 10 semillas cada caja.

Los tratamientos fueron los siguientes:

A- *Agua corriente (control).*

B- *Agua corriente + solución con PNP. Se preparó en un tubo plástico: 100 mL de agua + 10 µL de cultivo día cero¹ (solución 100 mg L⁻¹ de PNP).*

C- *Agua corriente con 0,01% del cultivo del día 5 (luego del proceso de biodegradación). Se preparó en un tubo plástico: 100 mL de agua + 10 µL cultivo día cuatro.*

Asimismo, se puede estimar que el tratamiento de agua sin tratar (B), tendrá una concentración de PNP de 0,01 mg L⁻¹.

Las semillas de *Vigna radiata* fueron regadas diariamente con las soluciones detalladas anteriormente manteniendo condiciones de alta humedad, se las incubó a temperatura ambiente y luz indirecta durante siete días. Luego se midieron los siguientes parámetros: longitud de radícula, longitud de plúmula, peso húmedo, porcentaje de germinación por tratamiento y Clorofila A.

Para comprobar que la cepa bacteriana biodegradó eficazmente PNP, se realizó un análisis estadístico de los resultados de las variables “longitud de plúmula” y “longitud de radícula”.

¹ Caldo LB líquido con 100 mg L⁻¹ de PNP inoculado con cepa JT-2 de 24 h de crecimiento.

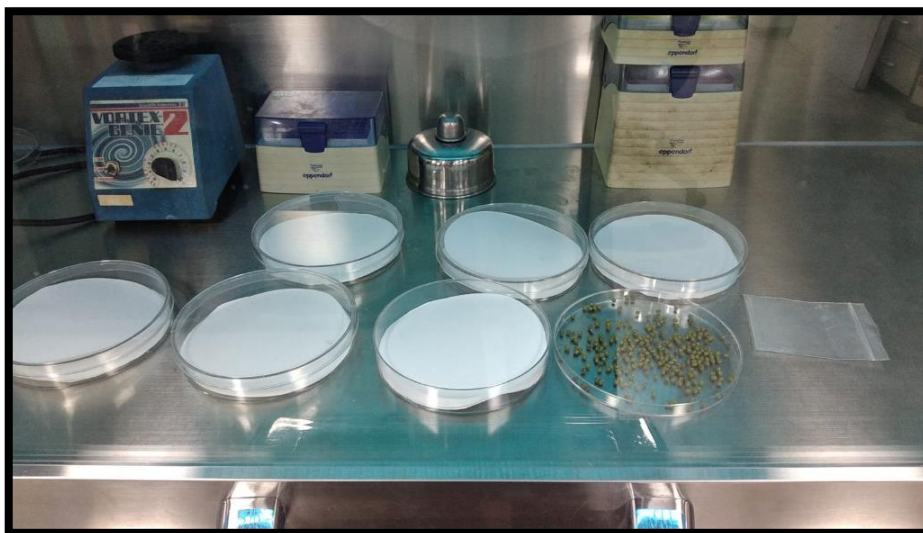


Figura 3: Material para estudio de fitotoxicidad.

Para llevar a cabo la estimación de la **clorofila A** de los germinados; se realizaron dos repeticiones por tratamiento. En primer lugar, se tomaron las plantas por unidad, se pesaron y colocaron en tubos plásticos de 15 mL, posteriormente se les agregó 10 mL de acetona y se las machacó lo máximo posible con ayuda de una varilla de vidrio (Figura 4-B). Al día siguiente las plántulas se filtraron y se tomaron 4 muestras de 150 μ L por tubo que se colocaron en placa de Elisa (Figura 4-A) para luego realizar la medición de la densidad óptica a 665, 645 y 730 nm. Se efectuaron duplicados por tratamiento. Posteriormente se realizó el cálculo de la Clorofila A con la siguiente fórmula (Wilhelm, S., 2017):

$$\text{mg L}^{-1} \text{ Chl A en el extracto} = 11.75 * (A_{665} - A_{730}) - 1.31 * (A_{645} - A_{730})$$

- Chl A = Clorofila A
- A665 = densidad óptica a 665 nm
- A730 = densidad óptica a 730 nm
- A645 = densidad óptica a 645 nm

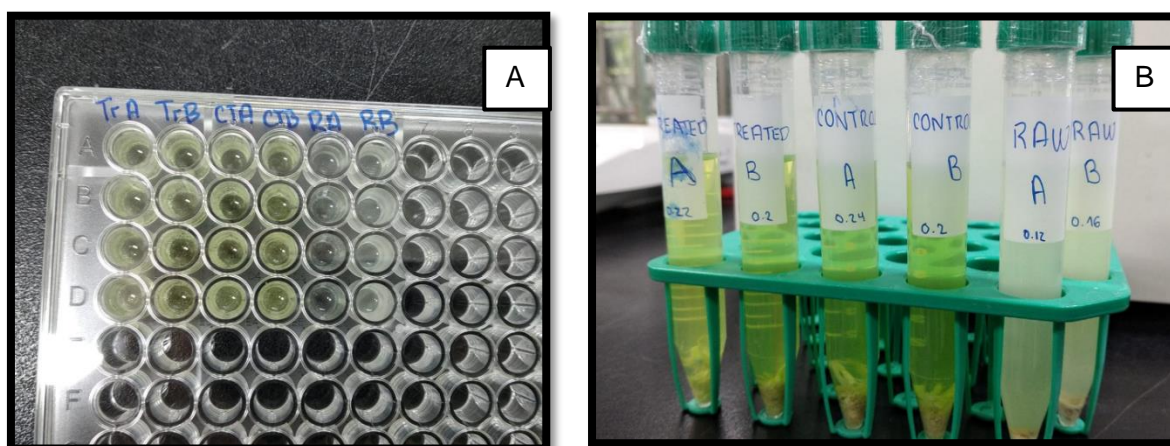


Figura 4: (A): Placa de Elisa con cuadruplicados por muestra para el análisis de DO. ;(B): Muestras con acetona correspondiente a los tres tratamientos.

2.5 QUINTA ETAPA: IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA

2.5.1 REPIQUE POR ESTRÍAS EN SUPERFICIE

Previo a la identificación de la cepa seleccionada, esta se cultivó en medio LB sólido en placa de Petri por el método de estrías por agotamiento en superficie (Figura 5). Mediante esta técnica se buscó obtener colonias separadas a partir de un inóculo. Para su realización: (i) se tomó la caja de Petri en la palma de la mano y ligeramente inclinada; con la mano contraria, se manipuló el asa de argolla previamente esterilizada y con ella se recogió el material de cultivo, para colocarlo en un área periférica de la caja haciendo movimientos circulares para homogeneizar el inóculo. (ii) El asa debió ser nuevamente flameada; a continuación, se realizó una estría partiendo de la primera y arrastrando los microorganismos presentes en ella hacia el extremo contrario de la superficie del agar. Se debió procurar que, en cada sección de la caja, las estrías queden trazadas con mayor separación. (iii) Se repitió el paso ii, por dos o tres veces, recordando flamear y enfriar el asa cada vez que culmine una estría y solo tocando con el asa la estría inmediatamente anterior, con el objetivo de ir reduciendo la carga microbiana arrastrada por la argolla. (Dirección de bromatología de Neuquén, 2021). De esta manera se lograron colonias aisladas que luego fueron enviadas a una empresa externa a la universidad de Chonbuk para su posterior análisis molecular.

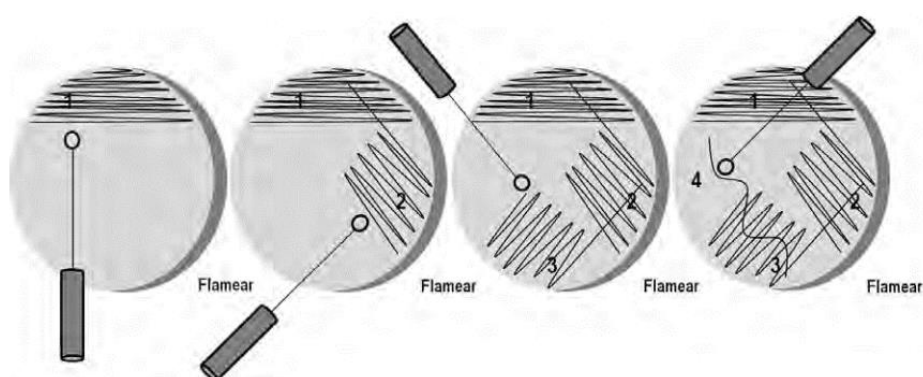


Figura 5: Pasos para la siembra de bacterias por la técnica de agotamiento por estrías en superficie. Fuente: Dirección de bromatología de Neuquén, 2021.

2.5.2 SECUENCIACIÓN MOLECULAR

Utilizando el kit de extracción de ADN genómico (Qiagen, USA), el ADN genómico total del aislado potencial fue extraído. Las secuencias parciales de ADNr 16S del aislado se amplificaron utilizando los cebadores universales 27f y 907r. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador seguido de las instrucciones del fabricante. Los amplicones se purificaron y secuenciaron utilizando un secuenciador de ADN automatizado (Applied Biosystem 3730XL DNA Analyser). Las secuencias se analizaron utilizando la herramienta NCBI BLAST. Todo el procedimiento fue realizado por una empresa externa a la universidad de Chonbuk, Corea del Sur.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todas las condiciones evaluadas, se realizó un análisis estadístico de los datos utilizando el software InfoStat (InfoStat versión 2020. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Donde en primera instancia se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las variables analizadas, luego se realizó un análisis de ADEVA con test de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia de 0,05. En aquellos casos donde supuestos no se cumplieron, se realizó la prueba de Kruskal Wallis para varianza no paramétrica.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PRIMERA ETAPA: SELECCIÓN DE UNA CEPA PARA EXPERIMENTOS POSTERIORES

Luego de 48 h de incubación de las 17 cepas bacterianas operadas, se realizó la medición de la densidad óptica en los medios de cultivo a 600 nm como parámetro de su crecimiento. Los resultados mostraron que solo dos de las diecisiete cepas fueron capaces de crecer bajo la presencia del xenobiótico con una concentración de 200 mg L⁻¹ (Figura 6). Se constató que este fue la causante de la inhibición del crecimiento de las demás cepas al comparar con un control sin presencia del compuesto. De las dos cepas que mostraron desarrollo (JT-2 y JT-9), se seleccionó a JT-2 para los posteriores experimentos debido a su mayor crecimiento.

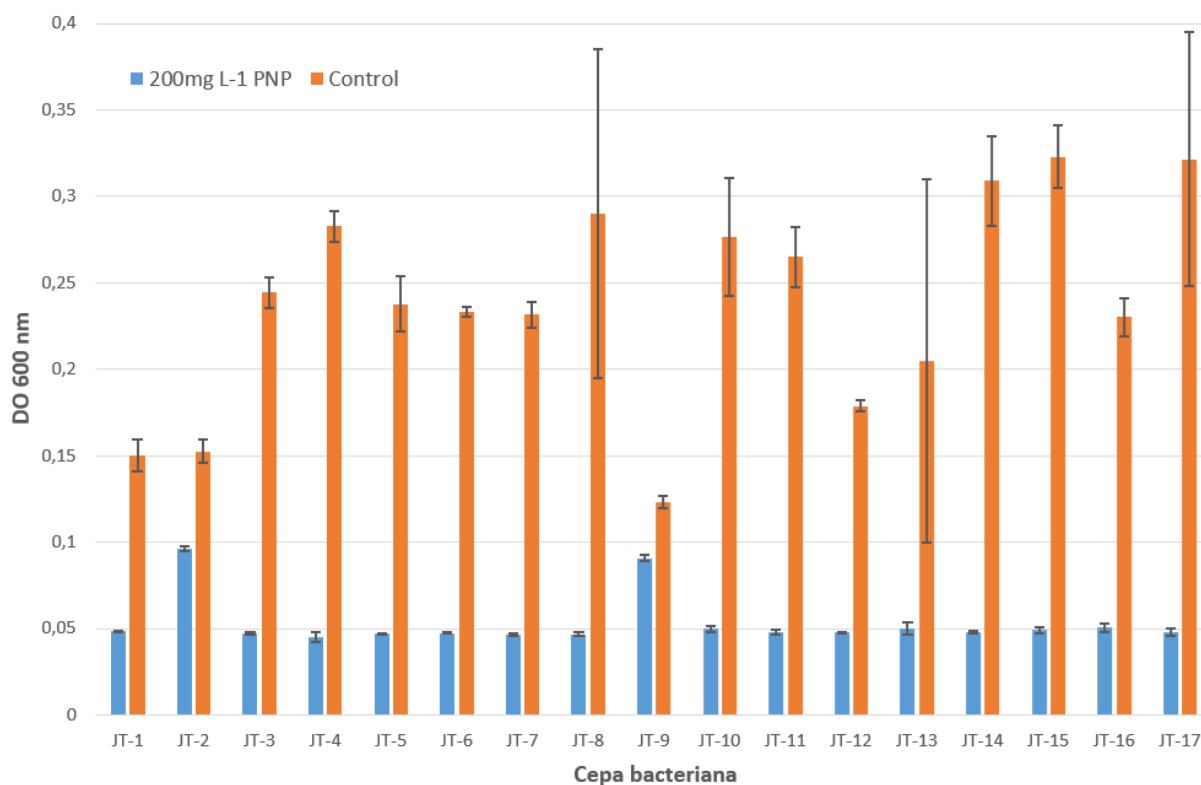


Figura 6: Media de la densidad óptica \pm DE a 600 nm para las 17 colonias bacterianas cultivadas (JT) por 48 h en caldo líquido LB suplementado con P-Nitrofenol (PNP).

3.1 SEGUNDA ETAPA: ESTUDIOS PRELIMINARES

3.1.1 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

La concentración mínima inhibitoria (MIC), es la menor concentración de un antimicrobiano en la cual un microorganismo presenta inhibido su crecimiento visible pasado un día en incubación (Andrews, 2001). Con el objetivo de hallar la MIC del PNP para el crecimiento de la cepa JT-2, se cultivó la bacteria con concentraciones crecientes del contaminante en caldo LB durante 24 h. La determinación de la MIC es de utilidad para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a diversos compuestos (Andrews, 2001).

En los resultados ([Figura 7](#)) se observa, que en concentraciones mayores a 150 mg L⁻¹ de PNP, el crecimiento de la bacteria se vio bruscamente disminuido. La mayoría de los compuestos nitroaromáticos, incluido el P-Nitrofenol, son tóxicos para los microorganismos (Bhatti et al., 2002) por lo que es probable que, a mayor concentración del xenobiótico, menor sea crecimiento de la cepa bacteriana.

Esta etapa experimental nos brindó una idea de carácter exploratorio del comportamiento de la bacteria a distintas concentraciones del contaminante. Cabe destacar que en este caso no se evaluó la biodegradación del xenobiótico, sino el crecimiento de la bacteria. En base a este análisis, se seleccionó la concentración inicial de 100 mg L⁻¹ de PNP para los posteriores experimentos, ya que el crecimiento de la bacteria fue comparativamente alto en relación al control. Asimismo, al contrastarlo con concentraciones trabajadas en los [estudios anteriores mencionados](#) (Luo et al., 2021 y Vijayan et al., 2021), se constata que la concentración inicial de 100 mg L⁻¹ es acertada para un proceso de biorremediación como el que se busca en esta instancia.

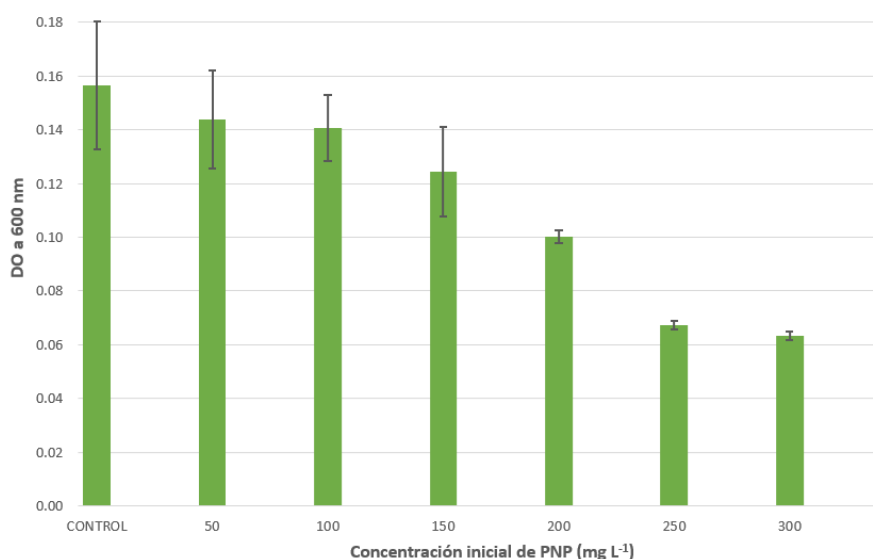


Figura 7: Densidad óptica a 600 nm de JT-2 a distintas concentraciones de PNP \pm desviación estándar. Dosis de inóculo de JT-2: 1% v/v. pH 7.

3.1.2 TEMPERATURA Y pH

La recopilación de información de la cepa seleccionada indicó que las condiciones de 30 °C y pH 7 fueron los ideales para el desarrollo de la cepa bacteriana JT-2, debido a que su crecimiento fue máximo bajo estas circunstancias. Como se mencionó anteriormente, estos estudios fueron realizados por la Dra. Sathya para cada una de las 17 cepas bacterianas iniciales. Los resultados del crecimiento de la cepa JT-2 a distintos niveles de pH y temperatura pueden ser observados en la figura 8-A y 8-B respectivamente.

La cepa, aislada de residuos de granja donde se criaban cerdos y gallinas, muy probablemente tuvo su origen en el tracto digestivo de alguno de estos animales. El pH de las heces de cerdo varía entre 6 y 7 (Estanguet, 2016). Por otro lado el pH de la gallinaza varía entre 5,5 y 6. Los valores de pH en las heces de ambas especies junto con los resultados de laboratorio indican que *Enterococcus gallinarum* provino de heces de cerdo.

Por otro lado, la temperatura corporal normal de un cerdo se encuentra entre 38 y 39 °C (Castro Alvarado et al., 2022) mientras que para gallinas aumenta a 40 °C (Peralta et al. 2016). Hay que tener en cuenta que el rango estudiado no abarca las temperaturas corporales mencionadas, por lo que no fue posible obtener el comportamiento de la bacteria en estas temperaturas (38 a 40 °C).

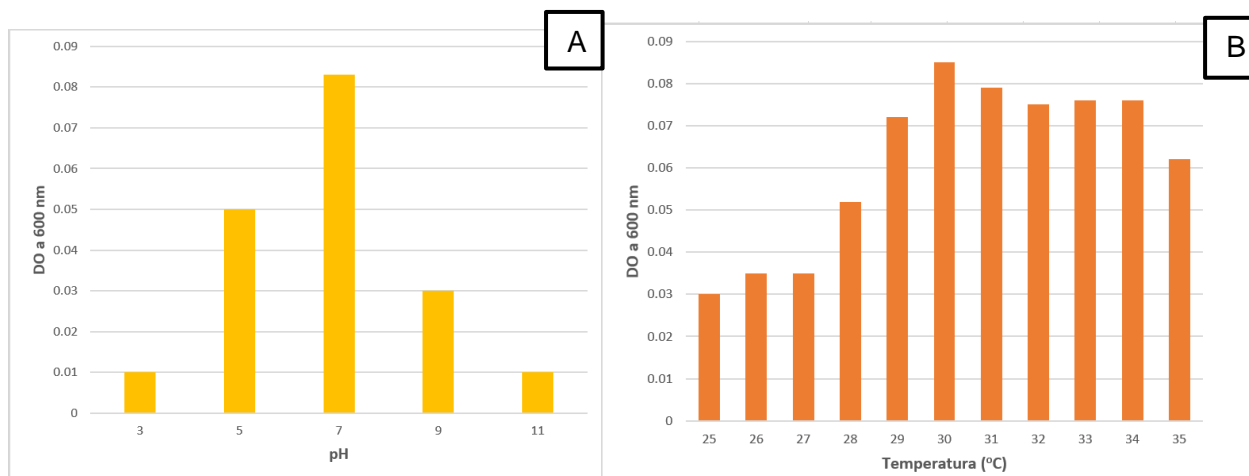


Figura 8: Densidad óptica de la cepa bacteriana JT-2 a distintos niveles de pH (A) y temperaturas (B) luego de 24 h de incubación.

3.2 TERCERA ETAPA: BÚSQUEDA DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE BIODEGRADACIÓN

La influencia de la **concentración inicial de PNP** fue estudiada con una dosis de inóculo de la cepa bacteriana JT-2 de 1 % v/v, pH 7 y 30 °C de temperatura (resultado de estudios preliminares) durante 4 días de tratamiento. Los resultados se pueden observar en la figura 9. Para los casos de concentración inicial de 50 y 100 mg L⁻¹, el porcentaje del compuesto biodegradado fue cercano al 94,90±0,08 y 91,00±0,06% respectivamente, mientras que la

biodegradación cayó sustancialmente a $56,00 \pm 0,04$ y $47,00 \pm 0,02\%$ en los casos de 250 y 300 mg L⁻¹ de PNP iniciales respectivamente. Se puede observar, por lo tanto, que la eficiencia de biodegradación aumenta conforme disminuye la concentración inicial del xenobiótico.

Samuel et al (2014) informaron que a una concentración de 50 mg L⁻¹ de PNP inicial, este se degradó rápida y completamente en 24 h, lo cual estuvo asociado con el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas putida*, sin embargo, este crecimiento se retrasó con el aumento de la concentración de PNP. La disminución de la degradación de PNP a concentraciones iniciales altas podría deberse a una actividad bacteriana reducida y a una transferencia limitada de masa y oxígeno conocido como el efecto de inhibición de oxígeno/inhibición de sustrato (Mohapatra, 2011).

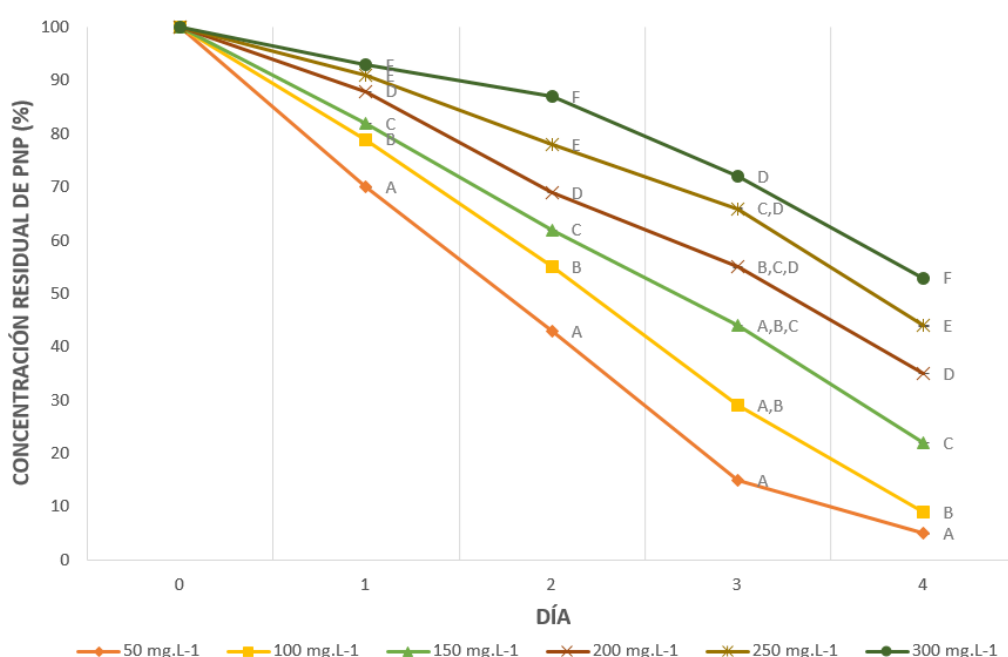


Figura 9: Biodegradación de PNP bajo distintas concentraciones iniciales del mismo por efecto de la cepa bacteriana JT-2 en caldo LB líquido, dosis de inóculo: 1% v/v. Concentración residual de PNP media expresada en porcentaje \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas al realizar una comparación de medias de Tukey (día 1, 2 y 4) y Kruskal Wallis (día 3), $p < 0,05$. Condiciones experimentales: pH: 7; Temperatura: 30 °C; RPM: 150.

En el análisis estadístico, el supuesto de normalidad y homocedasticidad fue comprobado para todos los días excepto el día tres (Anexo 6.4), por lo que para este caso se realizó el análisis de la varianza no paramétrica de Kruskal Wallis. Los resultados de la prueba de Tukey para los días 1, 2 y 4 revelaron diferencias significativas (Anexo 6.5), con un nivel de significancia de 0,05, para todas las concentraciones iniciales del xenobiótico, para todos los días analizados. Es decir que, desde el primer día del ensayo, el porcentaje de biodegradación de PNP entre los distintos tratamientos manifestó diferencias estadísticamente significativas, y las discrepancias fueron incrementando con el paso del tiempo. En el caso del día 3 (prueba de Kruskal Wallis), se encontraron 4 grupos significativamente diferentes entre sí con un nivel de significancia de 0,05, donde se encontraron tres niveles del tratamiento "Concentración

inicial de PNP” en cada uno (Figura 9). El tratamiento 100 mg L⁻¹ de PNP es significativamente diferente de los tratamientos 250 y 300 mg L⁻¹ según el análisis. Para ampliar el tema ir al [Anexo 6.5](#).

Como puede observarse, en los casos de las concentraciones iniciales 150, 200, 250 y 300 mg L⁻¹ de PNP, la curva muestra una tendencia al aumento de la velocidad de biodegradación (lo que se ve gráficamente como la pendiente de la curva), esto pudo deberse a una disminución en la toxicidad de la muestra, lo que permitió un mejor desarrollo de la bacteria. Por otro lado, en los casos de 50 y 100 mg L⁻¹ de PNP, la velocidad de biodegradación al inicio fue mayor que la de las demás concentraciones, pero luego disminuyó, probablemente debido a la escasez de producto a degradar. Al analizar esta tendencia, se puede inferir que la biodegradación se prolongaría más allá de los 4 días en los casos de mayores concentraciones de PNP (≥ 150 mg L⁻¹). No obstante, considerando el proceso para una escala mayor, más días de tratamiento implicarían mayor gasto económico y capacidad técnica. Dicho esto, la concentración inicial de PNP seleccionada es de 100 mg L⁻¹, debido a que en solo 4 días, se logró degradar 91% del xenobiótico en solución. Asimismo, en base a lo expuesto en la tabla 1, se observa que la concentración de PNP en efluentes industriales rara vez sobrepasa los 190 mg L⁻¹, por lo que se puede asumir que incluso a esta concentración del contaminante, la degradación será considerable.

Anteriormente, se ha trabajado con bacterias como *Ochrobactrum*, *Moraxella*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Ralstonia* y *Pseudomonas* para metabolizar PNP convirtiendo sus grupos nitro en nitritos y utilizando PNP como fuente de carbono y nitrógeno para su crecimiento. Las concentraciones trabajadas en estos estudios precedentes han variado entre 20 y 150 mg L⁻¹ (Samuel et al., 2014). Es por ello que trabajar con una concentración de 100 mg L⁻¹ se encuentra en un punto medio de lo trabajado en otras investigaciones.

La influencia de **distintos niveles de pH** en la degradación de PNP fue ensayada al variar los niveles desde pH 3 hasta pH 11. Los resultados (Figura 10) mostraron la mayor biodegradación (91,00±0,07%) en el caso de pH neutro (7). Mientras que esta fue de 82,00±0,19 y 58,00±0,16% para pH 9 y 11 respectivamente. Los menores grados de biodegradación fueron arrojados por los niveles de pH ácido: 3 y 5 expusieron 13,00±0,13 y 41,00±0,06% de biodegradación respectivamente.

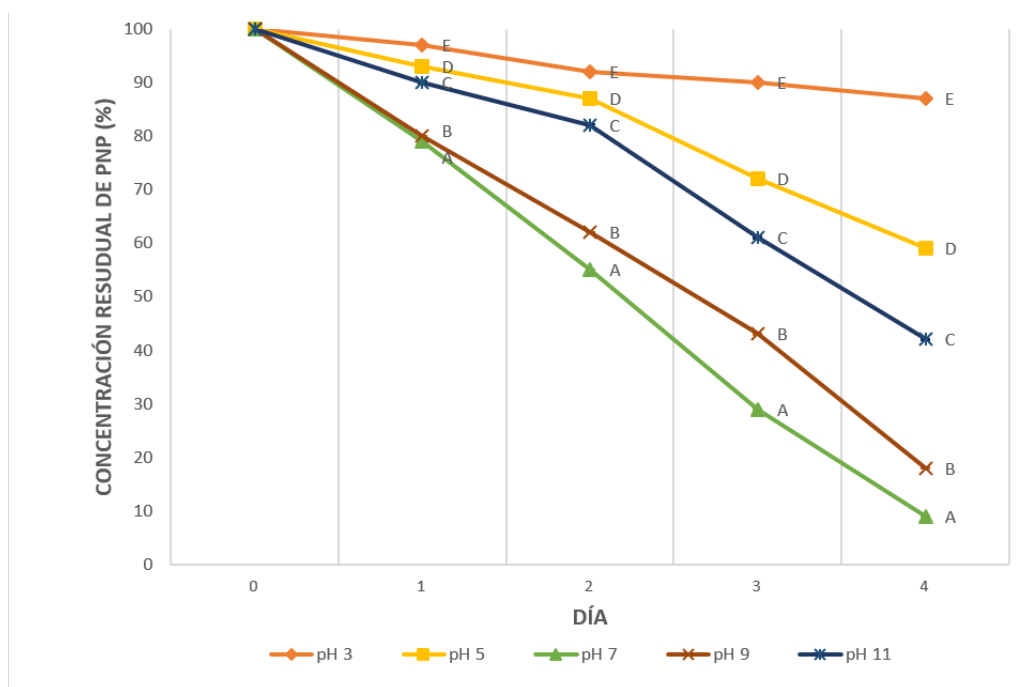


Figura 10: Biodegradación de PNP bajo distintos niveles de pH por efecto de la cepa bacteriana JT-2 en caldo LB líquido, dosis de inóculo: 1% v/v. Concentración residual de PNP media expresada en porcentaje \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas de análisis de la varianza con una comparación de medias de Tukey, $p < 0,05$. Condiciones experimentales: Concentración inicial de PNP: 100 mg L^{-1} ; Temperatura: 30°C ; RPM: 150.

De forma análoga al experimento anterior, se realizó el análisis estadístico correspondiente para comprobar la influencia del tratamiento “nivel de pH”. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad para un nivel de significancia de 0,05 fueron aceptados, los resultados pueden observarse en el Anexo 6.4. Se realizó la comparación de las medias de la variable “Porcentaje de PNP biodegradado” para los distintos niveles de pH, mediante la prueba de Tukey (Anexo 6.5). Los resultados demostraron que, para todos los niveles de pH, las medias de la variable fueron significativamente diferentes entre sí con un nivel de significancia de 0,05, para todos los días del tratamiento (Figura 8, Anexo 6.5). Es decir que incluso desde el primer día del ensayo, la influencia del pH fue considerable produciendo diferencias significativas entre las medias del porcentaje de biodegradación de PNP entre los distintos niveles del tratamiento.

La figura 11 muestra el efecto de la **dosis de inóculo** sobre la biodegradación de PNP. Las diferencias en la tasa de degradación al variar la dosis de inóculo fueron mínimas. Para las dosis de inóculo 1, 3 y 5% v/v, los porcentajes de biodegradación fueron de $91,00 \pm 0,13$; $96,00 \pm 0,06$ y $98,00 \pm 0,07\%$ respectivamente. Es de esperarse que, al aumentar la dosis de inóculo, al haber mayor cantidad inicial de bacterias, la biodegradación sea mayor. Boonyaroj et al. (2012), informaron que, con el aumento de la dosis de inóculo y el tiempo de tratamiento, hubo un aumento posterior en la tasa de degradación. Li et al. (2012) en su estudio infirieron que más células bacterianas pueden aumentar no solo la eficiencia sino también la tasa de la degradación. Sin embargo, en el presente estudio, las diferencias respecto a la tasa de

biodegradación en relación a la dosis de inóculo fueron menores a las observadas en los estudios mencionados, esto podría deberse a la alta biodisponibilidad de PNP en el aislado JT-02.

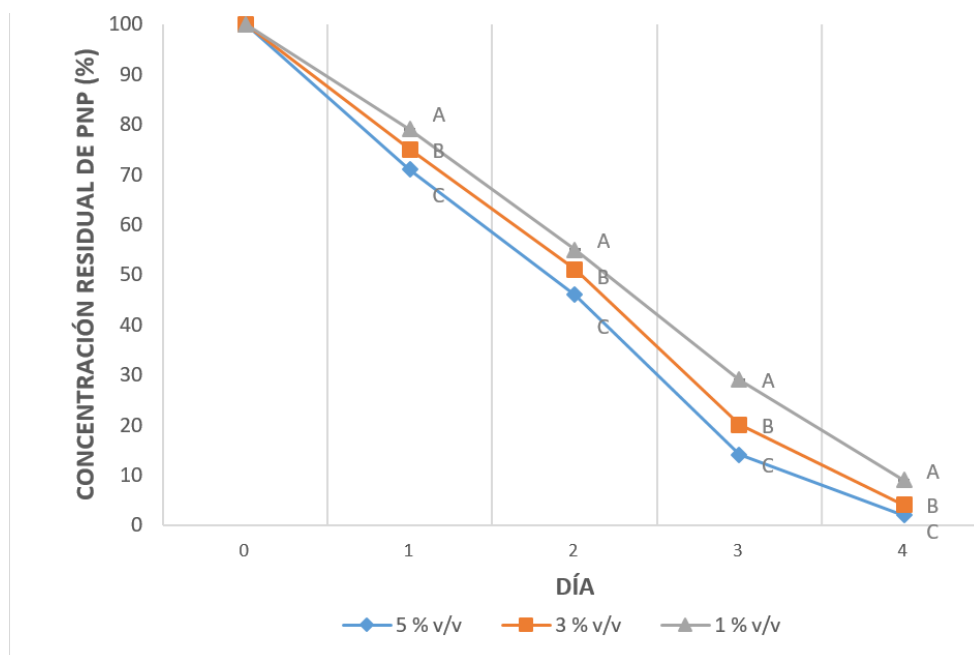


Figura 11: Biodegradación de PNP bajo distintas dosis de inóculo por efecto de la cepa bacteriana JT-2 en caldo LB líquido. Concentración residual de PNP media expresada en porcentaje \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas al realizar comparación de medias de Tukey, $p < 0,05$. Condiciones experimentales: Concentración inicial de PNP: 100 mg L^{-1} ; pH: 7; Temperatura: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; RPM: 150.

Finalmente, en el análisis estadístico, se evaluó la influencia de la dosis de inóculo sobre la biodegradación. Al igual que en los casos anteriores, se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad para un $p < 0,05$; los resultados pueden observarse en el [Anexo 6.4](#). Una vez comprobados, se prosiguió a realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey en el análisis de la varianza ([Anexo 6.5](#)). Para un nivel de significancia de 0,05, se demostró que existen diferencias estadísticamente significativas para los tres niveles del tratamiento, para todos los días. Es importante destacar que la desviación estándar de la variable “dosis de inóculo” fue muy baja en todos los casos, beneficiando la diferenciación de las medias bajo la prueba de Tukey.

La dosis de inóculo que se elija va a depender del porcentaje de biodegradación objetivo, los recursos que se posean, la factibilidad técnica, entre otras variables. En este estudio se seleccionó la dosis de 3% v/v, bajo el criterio costo-beneficio donde se consideró al inóculo como un recurso escaso y manteniendo una elevada biodegradación (96%).

3.3 CUARTA ETAPA: PRUEBAS DE VIABILIDAD/FITOTOXICIDAD

3.3.1 EFICIENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN AÑADIENDO EL FACTOR AGUA DE RÍO

Con el propósito de acercar el experimento a condiciones reales, se realizó un experimento con agua de río contaminada artificialmente con P-Nitrofenol. Los resultados del análisis físico-químico del agua utilizada pueden ser observados en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Resultados del análisis físico-químico de agua del río Sam-Ch'on, Jeonju-si, Corea del Sur.

PARÁMETRO	VALOR
pH	7,34
DO (mg L ⁻¹)	6,2
CE (μS cm ⁻¹)	653,5
SDT (mg L ⁻¹)	205,3
DQO (mg L ⁻¹)	48,1
DBO (mg L ⁻¹)	12,5

Los resultados de biodegradación del xenobiótico diluido en agua de río (Figura 12) se compararon con un control (compuesto diluido en agua destilada estéril). Las condiciones de los cultivos fueron 100 mg L⁻¹ de PNP inicial, dosis de 3% v/v de inóculo y pH 7. Los resultados demostraron que la solución de agua destilada estéril sobrepasó al agua de río en términos de biodegradación. La primera manifestó una degradación de 96,00±0,06%, mientras que la segunda, 86,00±0,13%. La reducción de la biodegradación en agua de río pudo deberse a numerosas razones que incluyen, entre otras, a la competencia con otras colonias bacterianas por los nutrientes o fuentes de carbono, a la mayor disponibilidad de ciertas moléculas que pueden ser inhibitorias, etc. A pesar de la observable reducción en la biodegradación, el experimento concluye en resultados positivos en cuanto a la biodegradación de PNP por parte de la bacteria en condiciones algo más próximas a la realidad.

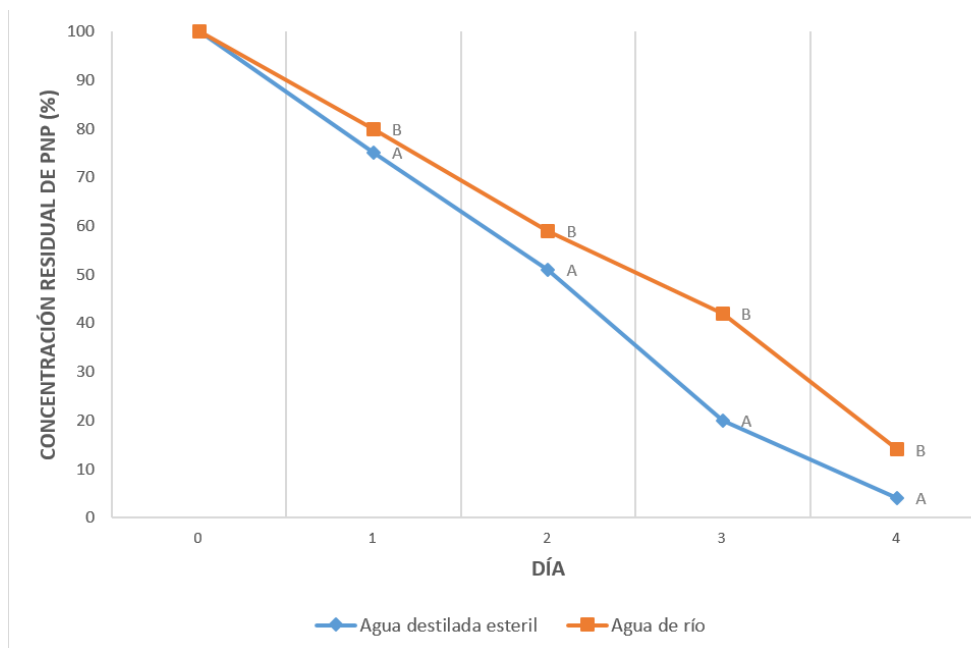


Figura 12: Biodegradación de PNP en agua de río artificialmente contaminada, inoculado con la cepa bacteriana JT-2 (dosis de inóculo: 3% v/v). Concentración residual de PNP media expresada en porcentaje \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas en la comparación de medias de Tukey, $p < 0,05$. Condiciones experimentales: Concentración inicial de PNP: 100 mg L^{-1} ; pH: 7; Temperatura: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; RPM: 150.

De igual manera que los ensayos anteriores, se realizó el análisis estadístico para comprobar si el efecto del agua de río produjo diferencias significativas en el porcentaje de biodegradación de PNP respecto al agua destilada estéril (control). En primera instancia, se pusieron a prueba los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Anexo 6.4), donde ambos fueron superados. Posteriormente se compararon las medias de los resultados de los tratamientos con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Los resultados indicaron que la biodegradación de PNP por parte de la cepa JT-2 al añadir el factor agua de río, presentó diferencias significativas a partir del primer día de tratamiento exhibiendo valores menores de biodegradación respecto al control. Sin embargo, esto puede deberse a que la desviación estándar en todos los casos fue muy baja, por lo que a pesar de que las medias no difieren considerablemente, presentan diferencias significativas. A pesar de los resultados, se puede afirmar que la cepa JT-2 logró reducir extensamente en un 86% la concentración del xenobiótico al añadir una matriz ambiental, tal como el agua de río.

Los resultados del ensayo indican que, posiblemente, el agua del río Sam-Ch'on en Jeonju-si, Corea del Sur, pudo tener algún componente inhibitorio para la bacteria, o la presencia de otros microorganismos que compitieron por el alimento con la cepa JT-2 de manera que se redujo su eficiencia en la degradación del xenobiótico.

3.3.2 ENSAYO DE FITOTOXICIDAD

En la figura 13, pueden observarse las características físicas de longitud de plúmula y radícula asociada a los tres tratamientos: control (agua), muestra no tratada (PNP no biodegradado) y muestra tratada (PNP biodegradado). Las semillas regadas con líquido sin tratar (con PNP)

mostraron una longitud de la radícula media y desviación de $12,30 \pm 3,08$ mm y longitud de plúmula de $2,45 \pm 3,22$ mm. Frente a un enorme contraste de $140,75 \pm 43,11$ mm y $98,6 \pm 13,41$ mm respectivamente correspondiente al tratamiento control. Por otro lado, el tratamiento de agua tratada expuso resultados alentadores, la longitud de radícula fue de $104,1 \pm 47,89$ mm y de plúmula $97,15 \pm 19,98$ mm.

En el análisis estadístico, ante la falta de cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Anexo 6.6), se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. En este caso, se observó que el tratamiento “agua sin tratar” resultó en valores significativamente menores de ambas variables “longitud de plúmula” y “longitud de radícula”, respecto al resto de los tratamientos. Al mismo tiempo, para las plantas regadas con agua tratada y el control, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables evaluadas. Esto comprueba que la reducción de PNP en el agua tratada fue considerable, reduciendo a su vez la fitotoxicidad del mismo, a tal punto que no se encontraron diferencias estadísticas con el control.

El peso húmedo total de las plántulas (figura 14-A) fue de 3,10 g en el caso de las semillas regadas con agua sin tratar y 4,91 g y 5,15 g en el caso del control y semillas regadas con agua tratada respectivamente.

Con respecto al porcentaje de germinación, se observó que el 100% de las semillas germinaron en todos los tratamientos. Sin embargo, para el caso de la muestra no tratada, el crecimiento se vio severamente interrumpido al poco tiempo, en la figura 15 (C) puede observarse profunda necrosis de todos los tejidos, podredumbre y desarrollo de hongos. En la misma imagen puede observarse como las plántulas correspondientes al tratamiento “tratado” (figura 15-B) y “control” (figura 15-A) exhiben desarrollo y crecimiento similar.

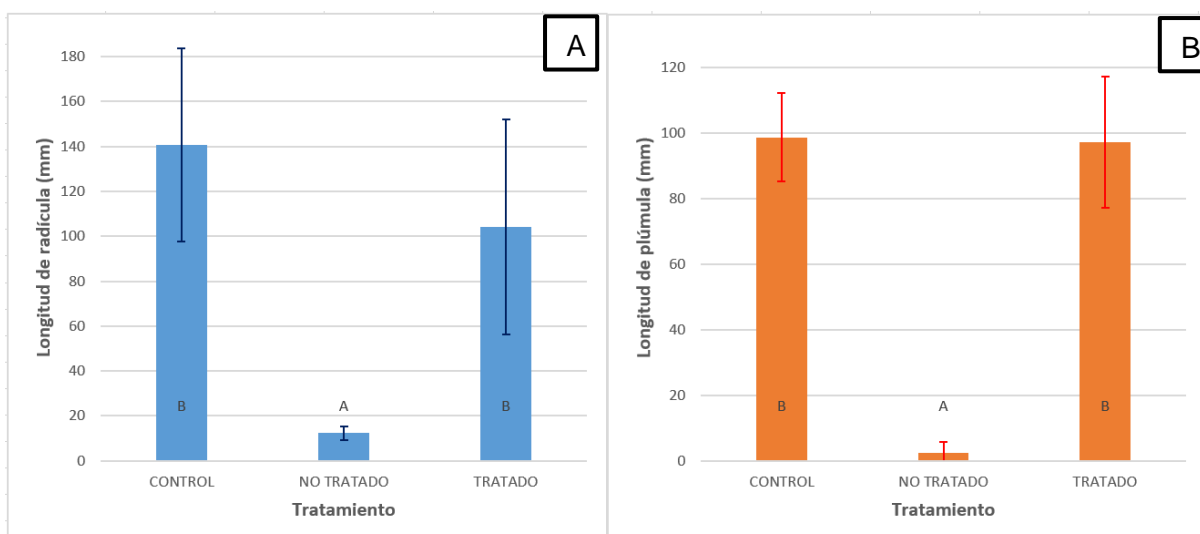


Figura 13: Media de longitud de radícula (A) y plúmula (B) en milímetros \pm desviación estándar, para los tres tratamientos (Control, Tratado y No Tratado) del ensayo de fitotoxicidad con *Vigna radiata*. Las letras indican diferencias significativas de medias bajo una prueba de Tukey, $p < 0.05$. Condiciones de incubación: luz indirecta, temperatura ambiente (≈ 25 °C) durante 7 días.

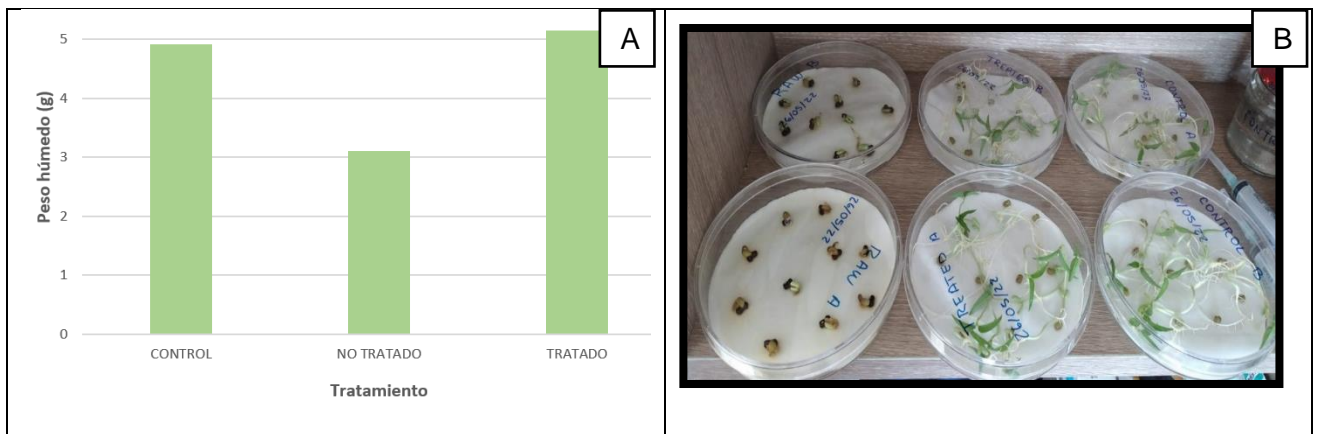


Figura 14: (A): Peso húmedo total en gramos de las plántulas de *V. radiata* (n=20) bajo los tratamientos: control, no tratado y tratado; (B): *Vigna radiata* en incubación luego de una semana de tratamiento.

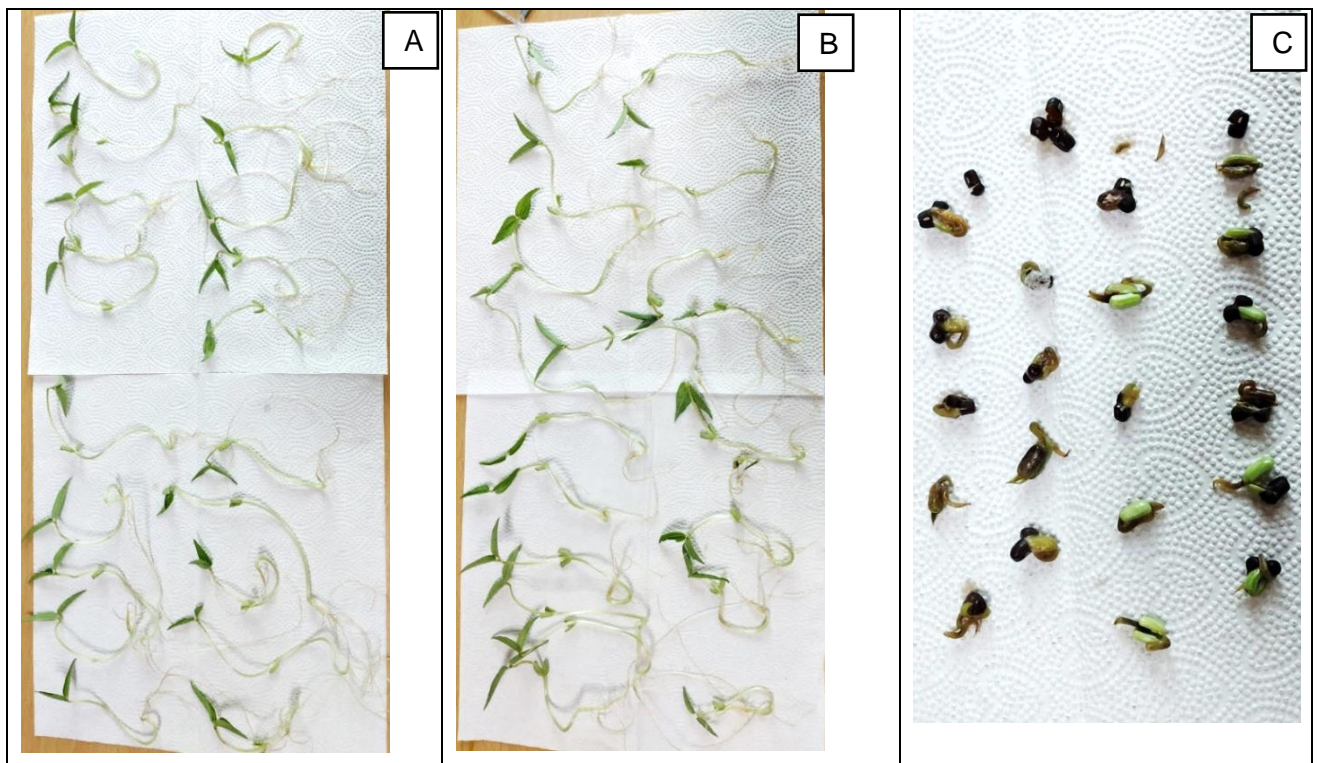


Figura 15: Plántulas de *Vigna radiata* regadas con: (A) agua corriente (control), (B) agua tratada, (C) agua sin tratar luego de una semana de incubación.

Otro factor importante fue la estimación de **clorofila A total**. En este estudio, las plantas del tratamiento de agua sin tratar demostraron la mínima producción de este pigmento ($0,36 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$) al compararlo con el control ($0,713 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Es destacable que, en el caso de agua tratada, la producción de clorofila A presentó el máximo valor ($0,837 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$).

Los resultados demuestran que la cepa bacteriana JT-2 biodegrada eficientemente el compuesto P-Nitrofenol y que por lo tanto la fitotoxicidad de la muestra tratada se reduce considerablemente al punto que no se hayan diferencias estadísticamente significativas con el control en los parámetros analizados.

Cabe subrayar la enorme toxicidad del compuesto PNP sobre *V. radiata*, debido a que con una mínima concentración de PNP en el agua de riego (tratamiento agua sin tratar - $0,01 \text{ mg}$

L⁻¹ de PNP) se observó un profundo deterioro de las plántulas al punto de provocar el cese de su crecimiento y muerte de las mismas poco después de la emergencia radicular.

3.4 QUINTA ETAPA: IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del rDNA 16S parcial objetivo dio como resultado 0,9 kb de amplicones. Las secuencias parciales de ADNr 16S de la cepa aislada JT-02 mostraron una identidad del 99% con *Enterococcus gallinarum* (GenBank: LC097066.1, Z. Zhi-hong, Z. et al 2020). En base a la identificación genética, se construye un árbol filogenético en base a la información provista por la herramienta NCBI Blast. La raíz del árbol representa el linaje ancestral, y los extremos de las ramas representan los descendientes. Cada linaje tiene una parte de historia que es única y otras partes que son compartidas con otros linajes, los cuales se van dividiendo (especiación) continuamente. La cepa bajo estudio, representada en azul en la [figura 16](#), se identificó como *Enterococcus gallinarum* por su elevada coincidencia genética con esta especie.

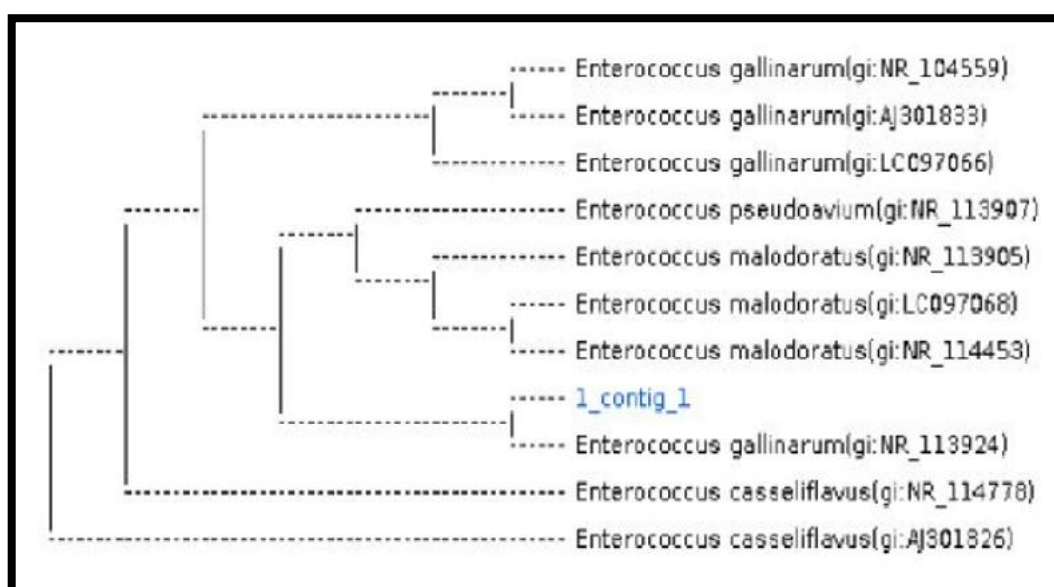


Figura 16: Árbol filogenético de la cepa bacteriana JT-2 construido en base a su identificación molecular.

El género *Enterococcus* incluye un conjunto de bacterias Gram positivas altamente versátiles y resistentes. Forman parte de la microbiota intestinal normal de individuos sanos e incluso en algunos casos se encuentran en el tracto genitourinario y en la saliva (Diaz, 2007). También son capaces de provocar infecciones en pacientes con patologías anteriores o inmunodeprimidos. Por otro lado, participan en la fabricación de muchos alimentos como el queso.

E. gallinarum se encuentra principalmente en el sistema digestivo de aves (Abriouel et al., 2008) por lo que se cree que posiblemente había presencia de gallinaza en el lodo donde la cepa JT-2 fue aislada, sin embargo, no se descarta que provenga del tracto intestinal de

cerdos por el análisis realizado anteriormente. *E. gallinarum* es mencionada en variedad de artículos científicos, no solo por su capacidad de biodegradación de moléculas contaminantes, sino también porque puede ser malicioso provocando infecciones sanguíneas, consecuentemente también existen estudios donde se trabaja la forma de inactivarlo (Moras González et al., 2021; Lanao, 2012).

En un estudio realizado por Bafana et al en el año 2009, *Enterococcus gallinarum* fue aislado de efluentes de una industria textil. Este fue capaz de biodegradar el compuesto Direct black 38 (DB38), una tintura ampliamente utilizada en la industria (donde entre el 10 y 15% se desecha). El compuesto tiene la particularidad de ser tóxico y cancerígeno. El tratamiento con la bacteria no solo logró decolorar el efluente, sino también reducir su toxicidad y propiedad cancerígena. En otro trabajo, *E. gallinarum* fue aislado del tracto gastrointestinal de caballos, búfalos y estiércol de elefante para luego ser utilizado para biodegradar compuestos lignocelulósicos (Wahyudi et al., 2010).

Según el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos, el género *Enterococcus* es el tercer causante más frecuente de infecciones nosocomiales, siendo estas bacterias responsables de más del 10% de todas las infecciones adquiridas en hospitales (Ortega González, 2010). Sin embargo, *Enterococcus gallinarum* no es el principal protagonista, en humanos, las especies más frecuentes son *E. faecalis* y *E. faecium* debido a que, entre ambos, suman aproximadamente el 90 % de los aislamientos clínicos del género (Porte et al., 2007). Otras especies como *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus* y *E. avium* se aíslan en menor proporción (Quiñones et al., 2008). En un estudio realizado en un hospital en Minnesota, de un total de pacientes infectados por bacterias del género *Enterococcus*, solo el 1,1% correspondió al *E. gallinarum*. Además, la totalidad de estos pacientes tenían graves condiciones médicas anteriores (Reid et al., 2001).

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se seleccionó una cepa bacteriana aislada de residuos de una granja porcina ubicada entre las localidades de Iksan y Jeonju, Corea del Sur por su resistencia al xenobiótico P-Nitrofenol. Luego se optimizó la capacidad de biodegradación del compuesto en distintas condiciones (nivel de pH, concentración inicial de PNP y dosis de inóculo) y se comprobó la fitotoxicidad del tratado final en plántulas de *Vigna radiata* (poroto mung). De esta manera se aceptó la hipótesis de trabajo gracias a que la cepa identificada como *Enterococcus gallinarum*, demostró biodegradar el xenobiótico P-Nitrofenol de manera eficiente y posible en condiciones de laboratorio.

Los objetivos previstos fueron alcanzados al conseguir que la bacteria degrade alrededor de un 96% del contaminante en 4 días para las condiciones seleccionadas. La máxima biodegradación de 98% se alcanzó al aplicar una dosis de inóculo de 5% v/v. Adicionalmente, en el ensayo de fitotoxicidad, se observó que las plantas expuestas al efluente tratado no demostraron diferencias respecto a las plantas regadas con agua (control), lo cual corrobora la efectividad de la biorremediación implementada. Sumado a esto, el crecimiento de las plantas tratadas con el efluente crudo fue significativamente inferior, indicando que la biodegradación por parte de la bacteria utilizada permite alcanzar niveles de PNP no tóxicos: demostrando la factibilidad del tratamiento.

Este trabajo da pie a continuar profundizando el estudio para comprobar si es posible aplicar el método en condiciones reales. De esta manera se evidencia la potencialidad de aplicación de esta tecnología a escalas mayores y eventualmente ser empleada en el tratamiento de aguas contaminadas con P-Nitrofenol. Por ende, de este estudio surgen nuevas líneas de investigación, que se plantean a continuación: en primer lugar, un estudio de biodegradación de PNP con *E. gallinarum* a mayor escala. En segundo lugar, estudiar la biodegradación a menores concentraciones de PNP y escasas de alimento, por ejemplo en un cuerpo de agua contaminado o en el tratamiento de efluentes industriales. Por último, se propone analizar la necesidad de eliminar la cepa antes de ser liberada a medios naturales, debido a una posible amenaza ecosistémica.

El uso de microorganismos para biorremediación es un campo que está en continuo crecimiento y que supone gran potencial, los microorganismos fueron los primeros en colonizar el planeta y exhiben rutas metabólicas y formas de adaptarse tan variadas como específicas. Es interesante pensar en la utilización de estos organismos benéficos, para lograr apañar el daño que la humanidad ha causado en el planeta, afectando la vida de ininidad de organismos y los ciclos biogeoquímicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). *The role of microorganisms in bioremediation-A review*. Open Journal of Environmental Biology, 2(1), 038-046.
- Abriouel, H. I. K. M. A. T. E., Omar, N. B., López, R. L., & Gálvez, A. N. T. O. N. I. O. (2008). *La doble faceta del género Enterococcus, y su importancia en alimentos*. Real Acad Ciencias Vet Andalucía Orient, 21(1), 66-74.
- Ahmed, E., Nagaoka, K., Fayez, M., Abdel-Daim, M. M., Samir, H., & Watanabe, G. (2015). *Suppressive effects of long-term exposure to P-nitrophenol on gonadal development, hormonal profile with disruption of tissue integrity, and activation of caspase-3 in male Japanese quail (Coturnix japonica)*. Environmental Science and Pollution Research, 22(14), 10930-10942.
- Alcaraz Fallas, J. M. (2009). *Disminución del contenido en p-nitrofenol de disoluciones acuosas mediante membranas líquidas en emulsión utilizando un mecanismo de transporte facilitado tipo I*.
- Álvarez-Torrellas, S.; Martín-Martínez, M.; Gomes, H.; Ovejero, G.; García, J. (2017). *Enhancement of p-nitrophenol adsorption capacity through N 2-thermal-based treatment of activated carbons*. Appl. Surf. Sci., 414, 424-434.
- Andrews, J. M. (2001). *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of antimicrobial Chemotherapy, 48(suppl_1), 5-16.
- Asman, W. A., Jorgensen, A., Bossi, R., Vejrup, K. V., Mogensen, B. B., & Glasius, M. (2005). *Wet deposition of pesticides and nitrophenols at two sites in Denmark: measurements and contributions from regional sources*. Chemosphere, 59(7), 1023-1031.
- Bafana, A., Chakrabarti, T., Muthal, P., & Kanade, G. (2009). *Detoxification of benzidine-based azo dye by E. gallinarum: Time-course study*. Ecotoxicology and environmental safety, 72(3), 960-964.
- Barr, D. B., Turner, W. E., DiPietro, E., McClure, P. C., Baker, S. E., Barr, J. R., ... & Sampson, E. J. (2002). *Measurement of p-nitrophenol in the urine of residents whose homes were contaminated with methyl parathion*. Environmental health perspectives, 110(suppl 6), 1085-1091.
- Bhatti, Z. I., Toda, H., & Furukawa, K. (2002). *P-Nitrophenol degradation by activated sludge attached on nonwovens*. Water Research, 36(5), 1135-1142.
- Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarošík, V., ... & Richardson, D. M. (2011). *A proposed unified framework for biological invasions*. Trends in ecology & evolution, 26(7), 333-339.
- Boutin C, Freemark KE y Keddy CJ. (1993). *Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: nontarget plant testing and evaluation*. Technical Report Series N° 145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environmental Canada, Ottawa.
- Carrillo-Pérez, E., E. Ruiz-Manriquez, A., y Yeomans-Reina, H. (2011). *Aislamiento, identificación y evaluación de un cultivo mixto de microorganismos con capacidad para degradar DDT*. Revista internacional de contaminación ambiental, 20, 69-75.
- Castro Alvarado, A. F., & González Crisóstomo, A. G. (2022). *Comparación de la temperatura corporal por medio de medidas termográficas y termógrafos intestinales en cerdos en condiciones de estrés por calor* (Bachelor's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- Chang, Y., Lv, X., Zha, F., Wang, Y., & Lei, Z. (2009). *Sorption of p-nitrophenol by anion-cation modified palygorskite*. Journal of Hazardous Materials, 168(2-3), 826-831.
- Chong, N. M., & Huang, J. C. (2012). *Production of xenobiotic degrader for potential application in bioaugmentation*. Bioresource Technology, 125, 305-311.
- Croom, E. (2012). *Metabolism of xenobiotics of human environments*. Progress in molecular biology and translational science, 112, 31-88.
- D. Mohapatra, S. Brar, R. Tyagi, R. Surampalli. (2011). *Parameter optimization of ferro-sonication pre-treatment process for degradation of bisphenol A and biodegradation from wastewater sludge using response surface model*. Journal of hazardous materials, 189, 100-107.
- DE CALIDAD, H. L. P., EL, T. A. Q. D. S., & SU, A. P. (1994). *Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización*.

- Degli-Innocenti, F., Bellia, G., Tosin, M., Kapanen, A., Itavaara, M. (2001). *Detection of toxicity released by biodegradable plastics after composting in activated vermiculite*. Polym. Degrad. Stabil. 73, 101-106.
- Díaz Álvarez M, Salas Izquierdo CC, Fernández de la Paz MT, Martínez Izquierdo A. (2007) *Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por enterococos en el niño*. Revista Cubana de Pediatría.
- Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., y Zhurbenko, R. (2010). *Aspectos fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad*. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 48(2), 147-161.
- Dirección de bromatología de Neuquén. (2021). *Procedimientos de microbiología general*. ANAL-MIC-POES 005.
- Dr Paul Gates, School of Chemistry, University of Bristol. (s.f.). *Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS)*. University of Bristol.
- E. Ahmed, K. Nagaoka, M. Fayez, M.M. Abdel-Daim, H. Samir, G. Watanabe. (2015). *Suppressive effects of long-term exposure to P-nitrophenol on gonadal development, hormonal profile with disruption of tissue integrity, and activation of caspase-3 in male Japanese quail (Coturnix japonica)*. Environmental Science and Pollution Research, 22, 10930-10942.
- E.w. group. (1980). *Ambient water quality criteria for nitrophenols*.
- EPA, U. (1980). *Ambient Water Quality Criteria for Nitrophenols*. US Environmental Protection Agency.
- Estanguet, A. A. (2016). *Desarrollo de un protocolo estandarizado para la caracterización clínica de la materia fecal de cerdos en crecimiento y terminación*.
- Fuentes Jorquera, N. A. (2012). *Estudio de los compuestos fenólicos en rocío de la ciudad de Santiago*.
- G. Li, L. Zu, P.-K. Wong, X. Hui, Y. Lu, J. Xiong, T. An. (2012). *Biodegradation and detoxification of bisphenol A with one newly-isolated strain Bacillus sp. GZB: kinetics, mechanism and estrogenic transition*. Bioresource Technology, 114, 224-230.
- Gallo Mendoza, Guillermo. (2006). *Agroquímicos prohibidos o restringidos en Argentina*. Disponible en:
https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/bpa/bibliografia/Minagro_Agroquimicos_prohibidos.pdf
- Gil, Marielsa. (2019). *P-Nitrofenol: características, usos y toxicidad*. Lifeder.
- H. Mohan, J.-M. Lim, M. Cho, Y.-J. Park, K.-K. Seralathan, B.-T. Oh. (2020). *Remediation of BTEX and Cr (VI) contamination in soil using bioelectrochemical system—an eco-friendly approach*. Environmental Science and Pollution Research, 27, 837-845.
- Ha, G. H., Mohan, H., Oh, H. S., Kim, G., Seralathan, K. K., & Shin, T. (2022). *Photocatalytic degradation of tetracycline using hybrid Ag/Ag₂S@ BiOI nanowires: Degradation mechanism and toxicity evaluation*. Chemosphere, 303, 135091.
- Howard P. (1989). *Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemical*. Volume I: "Large production and priority pollutants". Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA.
- Howard, H., et al. (1976). *Investigation of selected potential environmental contamination: Nitroaromatics*. Off. Tox. Subst. U.S. Environ. Prot. Agency, Washington, D.C.
- Hu X., Li A., Fan J., Deng C., Zhang Q. "Biotreatment of p-nitrophenol and nitrobenzene in mixed wastewater through selective bioaugmentation" (2007). Bioresource Technology 99 (2008) 4529–4533.
- Inglezakis, V. J., Malamis, S., Omirkhan, A., Nauruzbayeva, J., Makhtayeva, Z., Seidakhmetov, T., & Kudarova, A. (2017). *Investigating the inhibitory effect of cyanide, phenol and 4-nitrophenol on the activated sludge process employed for the treatment of petroleum wastewater*. Journal of environmental management, 203, 825-830.
- Knackmuss, H. J. (1996). *Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds*. Journal of biotechnology, 51(3), 287-295.
- Kotronarou, A., Mills, G., & Hoffmann, M. R. (1991). *Ultrasonic irradiation of p-nitrophenol in aqueous solution*. The journal of physical chemistry, 95(9), 3630-3638.
- Kubota, A. H. (2000). *Metodología de indicadores de dose interna para avaliação em trabalhadores expostos a pesticidas organofosforados*.

- Kucherenko, S. V., Ovcharenko, A. M., & Pushenko, S. L. (2021). *Xenobiotics: a threat to the health of living organisms*. In *E3S Web of Conferences*. EDP Sciences. (Vol. 285). p. 03006.
- Luo, J., Xu, Y., Wang, J., Zhang, L., Jiang, X., & Shen, J. (2021). *Coupled biodegradation of p-nitrophenol and p-aminophenol in bioelectrochemical system: Mechanism and microbial functional diversity*. *Journal of Environmental Sciences*, 108, 134-144.
- M.S. Samuel, A. Sivaramakrishna, A. Mehta. (2014). *Bioremediation of p-Nitrophenol by Pseudomonas putida 1274 strain*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12 (2014) 1-8.
- Moellering RC Jr. (1998). *Vancomycin-resistant enterococci*. *Clin Infect Dis*, 26, 1196–1199.
- Mohan R. S. & Hosetti B. B. (1999). *Aquatic plants for toxicity assessment*. Review. *Environmental Research*. Section A. 81, 259-274.
- Mohan, H., Lim, J. M., Lee, S. W., Cho, M., Park, Y. J., Seralathan, K. K., & Oh, B. T. (2020). *Enhanced removal of bisphenol A from contaminated soil by coupling Bacillus subtilis HV-3 with electrochemical system*. *Chemosphere*, 249, 126083.
- Mohan, H., Lim, J. M., Lee, S. W., Cho, M., Park, Y. J., Seralathan, K. K., & Oh, B. T. (2020). *V2O5/RGO/Pt nanocomposite on oxytetracycline degradation and pharmaceutical effluent detoxification*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(1), 297-307.
- Mohan, H., Ramalingam, V., Karthi, N., Malathidevi, S., Shin, T., Venkatachalam, J., & Seralathan, K. K. (2021). *Enhanced visible light-driven photocatalytic activity of reduced graphene oxide/cadmium sulfide composite: methylparaben degradation mechanism and toxicity*. *Chemosphere*, 264, 128481.
- Mohan, H., Sathya, P. M., Vadivel, S., Ha, G. H., Oh, H. S., Kim, G., ... & Shin, T. (2022). *Highly efficient visible light photocatalysis of Nix Zn1-x Fe2O4 (x= 0, 0.3, 0.7) nanoparticles: Diclofenac degradation mechanism and eco-toxicity*. *Chemosphere*, 301, 134699.
- Mohan, H., Vadivel, S., Lee, S. W., Lim, J. M., Lovanh, N., Park, Y. J., ... & Oh, B. T. (2022). *Improved visible-light-driven photocatalytic removal of Bisphenol A using V2O5/WO3 decorated over Zeolite: Degradation mechanism and toxicity*. *Environmental Research*, 212, 113136.
- Moras González, R., & Miguel Salcedo, N. (2021). *Degradación de sulfadiazina e inactivación de Enterococcus sp. mediante procesos avanzados de oxidación basados en ozono y radicales de sulfato*. *Escuela politécnica de Huesca*.
- Nisha, P., & Sreedevi, S. (2008). *Phytotoxicity of mercury on seed germination in Vigna radiata (L.) Wilczek*. *Biodiversity conservation*. Scientific Publishers, 227-234.
- Nishioka, M. G., & Lewtas, J. (1992). *Quantification of nitro-and hydroxylated nitro-aromatic/polycyclic aromatic hydrocarbons in selected ambient air daytime winter samples*. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 26(11), 2077-2087.
- Noticias ONU, Naciones Unidas. (2019). *Más de 2000 millones de personas no tienen acceso a agua potable ni saneamiento básico*.
- Olaniran, A. O., Balgobind, A., & Pillay, B. (2013). *Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies*. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 10197-10228.
- Ortega González, L. M. (2010). *Enterococos: actualización*. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(4), 507-515.
- Pang, Y., & Lei, H. (2016). *Degradation of p-nitrophenol through microwave-assisted heterogeneous activation of peroxymonosulfate by manganese ferrite*. *Chemical Engineering Journal*, 287, 585-592.
- Peña Martínez, M. (2014). *Síntesis de nanopartículas metálicas y su aplicación en la reducción de 4-nitrofenol por un consorcio microbiano anaerobio* (Master's thesis).
- Peralta, a., Patiño, r., & Arrieta, k. (2016). *Desempeño productivo y conductas etológicas de gallinas ponedoras en tres tipos de manejo en condiciones de trópico cálido*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 8, 310-318.
- Porte L, Hervé B, Prat S, Chanqueo L. (2007). *Enterococcus sp. Parte I*. *Rev Chil Infect*; 24(3), 231.
- Programa Mundial de la UNESCO de Evaluación de los Recursos Hídricos. (2017). *Aguas residuales: El recurso desaprovechado*. París, UNESCO.

- Quiñones Pérez D, Marrero D, Falero B, Tamargo I, Llop A, Kobayashi N, et al. (2008). *Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de Enterococcus causantes de infecciones pediátricas en Cuba*. Rev Cubana Med Trop; 60(2).
- Quinto, J. O. (2006). *Control biológico de trabajadores expuestos a plaguicidas (II): técnicas específicas*.
- Reid, K. C., Cockerill III, F. R., & Patel, R. (2001). *Clinical and epidemiological features of Enterococcus casseliflavus/flavescens and Enterococcus gallinarum bacteremia: a report of 20 cases*. Clinical infectious diseases, 32(11), 1540-1546.
- Rieger, P. G., Meier, H. M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., & Knackmuss, H. J. (2002). *Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence*. Journal of Biotechnology, 94(1), 101-123.
- Ruiz Muñoz, G. (2010). *Fotólisis homogénea de 2-, 3-y 4-Nitrofenol*. Master's thesis.
- S. S, S. M., Vijayan, D. S., Anand, M., Ajona, M., & Jarin, T. (2021). *Biodegradation of P-nitrophenol using a novel bacterium Achromobacter denitrificans isolated from industrial effluent water*. Water Science and Technology, 84(10-11), 3334-3345.
- Salazar, D., José, A., Huamán Inca, P. J., Montenegro Pisfil, J., Spiner Gutierrez, J., y Zarsoza Robles, N. A. (2014). *Seminario iii–biodegradacion de contaminantes xenobioticos: biorremediacion de suelos, acuíferos, derrames de petroleo, relaves mineros*.
- Samuel, Melvin S; Sivaramakrishna, Akella; Mehta, Alka (2014). *Bioremediation of p-Nitrophenol by Pseudomonas putida 1274 strain*. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 12(1), 53.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. (1993). *Resolución 606/93: Prohíbese la fabricación, importación y comercialización de los productos formulados a base de los principios activos Metil Paration y Etil Paration*.
- Singleton, I. (1994). *Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology, 59(1), 9-23.
- Sobrero, M. C. (2010). *Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos*. Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata.
- Stöfen, D. (1973). *The maximum permissible concentrations in the USSR for harmful substances in drinking water*. Toxicology, 1(3), 187-195.
- Suja, E., Nancharaiyah, Y. V., & Venugopalan, V. P. (2012). *P-Nitrophenol biodegradation by aerobic microbial granules*. Applied biochemistry and biotechnology, 167(6), 1569-1577.
- U.S. Environmental Protection Agency. (2015). *National Pesticide Survey: 4-Nitrophenol Publications*. U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA.
- UNESCO World Water Assessment Programme. (2017). *Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos, 2017: Aguas residuales: el recurso no explotado* (G. Ryder, Ed.). París, Francia.
- V. Boonyaraj, C. Chiemchaisri, W. Chiemchaisri, S. Theepharaksapan, K. Yamamoto. (2012). *Toxic organic micro-pollutants removal mechanisms in long-term operated membrane bioreactor treating municipal solid waste leachate*, Bioresource technology, 113, 174-180.
- Van Deuren, J., Ledbetter, J., & Wang, Z. (1997). *Remediation technologies screening matrix and reference guide*. LGS Turner & Associates, Limited.
- Wahyudi, A., Cahyanto, M. N., Soejono, M., & Bachruddin, Z. (2010). *Potency of lignocellulose degrading bacteria isolated from buffalo and horse gastrointestinal tract and elephant dung for feed fiber degradation*. Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture, 35(1), 34-41.
- Wilhelm, S. (2017). *Total Chlorophyll a Measurements by Spectrophotometer*. Protocols.io.
- Yang, J., Pan, B., Li, H., Liao, S., Zhang, D., Wu, M., & Xing, B. (2016). *Degradation of p-nitrophenol on biochars: role of persistent free radicals*. Environmental science & technology, 50(2), 694-700.
- Yoo, S., Mohan, H., Oh, H. S., Kim, G., Hahn, J. R., & Shin, T. (2022). *Pd@ PdS core shell nanocubes for photocatalytic degradation of methylparaben*. Materials Letters, 309, 131444.
- Z. Zhi-hong, Z. Ling-ying, Z. Ying-jie, S. Zao-tang, C. Si-ying, X. Guan-li, L. Wei-wei, C. Bin1. (2020). *Species and antibiotic sensitivity of culturable gut bacteria of Spodoptera rugiperda larvae from Mangshi , Yunnan*. Journal of Southern Agriculture, 51, 1293-1299.

- Zhang, H., Ji, Q., Lai, L., Yao, G., & Lai, B. (2019). *Degradation of p-nitrophenol (PNP) in aqueous solution by mFe/Cu-air-PS system*. Chinese Chemical Letters, 30(5), 1129-1132.
- Zhu, X., & Ni, J. (2009). *Simultaneous processes of electricity generation and p-nitrophenol degradation in a microbial fuel cell*. Electrochemistry Communications, 11(2), 274-277.
- Zimicz, C. C., & Moretto, A. S. (2019). *Toxicidad bórica en la germinación y desarrollo temprano del poroto mung [Vigna radiata (L.) Wilczek]*. Agronomía y Ambiente, 39(1).

6. ANEXOS

6.1 Resultados crudos de la cuarta etapa “Búsqueda de condiciones óptimas para la biodegradación”. Resultados producto de medición GC-MS.

Tabla A 1: Concentración residual de PNP en $\text{mg L}^{-1} \pm$ desviación estándar para el tratamiento de biodegradación por parte de la cepa JT-2 con distintas concentraciones iniciales de PNP durante 4 días de ensayo.

DÍA	CONCENTRACION INICIAL DE PNP (mg L^{-1})					
	50	100	150	200	250	300
0	48,77±0,087	100,23±0,011	143,55±0,032	198,42±0,002	249,88±0,001	302,1±0,063
1	34,14±0,04	79,18±0,012	117,71±0,001	174,61±0,059	227,39±0,087	280,95±0,066
2	20,97±0,045	55,13±0,000	89±0,081	136,91±0,037	194,91±0,043	262,83±0,003
3	7,32±0,077	29,07±0,022	63,16±0,048	109,13±0,038	164,92±0,049	217,51±0,077
4	2,49±0,043	9,02±0,066	31,58±0,074	69,45±0,013	109,95±0,097	160,11±0,099

Tabla A 2: Concentración residual de PNP en $\text{mg L}^{-1} \pm$ desviación estándar para el tratamiento de biodegradación por parte de la cepa JT-2 con distintos niveles de pH durante 4 días de ensayo.

DÍA	pH				
	3	5	7	9	11
0	100,02±0,000	101,16±0,000	100,95±0,000	99,98±0,000	101,2±0,000
1	97,02±0,197	94,08±0,039	79,75±0,012	79,98±0,626	91,08±0,336
2	92,02±0,149	88,01±0,219	55,52±0,000	61,99±0,257	82,98±0,513
3	90,02±0,131	72,84±0,319	29,28±0,022	42,99±0,275	61,73±0,354
4	87,02±0,134	59,68±0,059	9,09±0,066	18±0,190	42,5±0,157

Tabla A 3: Concentración residual de PNP en $\text{mg L}^{-1} \pm$ desviación estándar para el tratamiento de biodegradación por parte de la cepa JT-2 con distintas dosis de inóculo durante 4 días de ensayo.

DÍA	DOSIS DE INÓCULO (v/v)		
	1	3	5
0	100,23±0,000	101,01±0,000	99,87±0,000
1	79,18±0,197	75,76±0,039	70,91±0,012
2	55,13±0,149	51,52±0,219	45,94±0,000
3	29,07±0,131	20,20±0,319	13,98±0,022
4	9,02±0,134	4,04±0,059	2,00±0,066

6.2 Resultados crudos de la quinta etapa “Pruebas de viabilidad”. Resultados producto de medición GC-MS.

Tabla A 4: Concentración residual de PNP en $\text{mg L}^{-1} \pm$ desviación estándar para el tratamiento de biodegradación por parte de la cepa JT-2 con PNP diluido en agua de río durante cuatro días de ensayo.

DÍA	TRATAMIENTO	
	Agua Destilada Estéril (Control)	Agua de Río
0	100,11±0,000	99,98±0,000
1	75,08±0,039	79,98±0,197
2	51,06±0,219	58,99±0,149
3	20,02±0,319	41,99±0,131
4	4,00±0,059	14,00±0,134

6.3 Resultados crudos de la quinta etapa “Pruebas de fitotoxicidad”. Resultados producto de medición GC-MS.

Tabla A 5: Resultados del ensayo de fitotoxicidad. Long. de plúmula y radícula (mm), peso húmedo (g) y germinación (%). n=20.

Repetición	CONTROL		NO TRATADO		TRATADO	
	Long. Radícula (mm)	Long. Plúmula (mm)	Long. Radícula (mm)	Long. Plúmula (mm)	Long. Radícula (mm)	Long. Plúmula (mm)
1	176	100	9	0	173	118
2	145	94	13	4	74	93
3	210	84	11	0	54	100
4	134	115	10	5	80	130
5	134	119	10	2	136	106
6	94	102	15	0	45	63
7	212	90	10	5	61	97
8	65	87	13	7	123	95
9	110	78	11	4	196	117
10	197	91	20	5	54	69

11	167	125	6	0	148	126
12	171	109	12	11	147	96
13	132	109	10	0	94	112
14	109	100	17	0	73	103
15	176	107	14	0	161	74
16	98	93	15	0	160	95
17	168	106	13	0	115	82
18	106	101	11	6	47	112
19	75	74	12	0	58	97
20	136	88	14	0	83	58
MEDIA	140,75	98,6	12,3	2,45	104,1	97,15
Desviación Estándar	43,11	13,41	3,08	3,22	47,89	19,98
Peso húmedo (g)	4,91		3,1		5,15	
Germinación (%)	100		100		100	

6.4 Análisis estadístico – Supuestos del ANOVA para las distintas variables evaluadas.

Tabla A 6: Prueba de supuestos de normalidad y homocedasticidad para las variables evaluadas.

VARIABLE EVALUADA	SUPUESTO DE NORMALIDAD	SUPUESTO DE HOMOCEDESTICIDAD																																																																																																																																																																								
	PRUEBA DE SHAPIRO-WILKS MODIFICADA Y GRÁFICO QQ-PLOT DE LOS RESIDUOS	ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE LOS RESIDUOS ABSOLUTOS	GRÁFICO DE DISPERSIÓN DE RESIDUOS VS PREDICHOS																																																																																																																																																																							
Concentración inicial de PNP	<p>Shapiro-Wilks (modificado)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>DIA</th> <th>Variable</th> <th>n</th> <th>Media</th> <th>D.E.</th> <th>W*</th> <th>p(Unilateral D)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>RDUO % BIOD</td> <td>18</td> <td>0.00</td> <td>0.02</td> <td>0.88</td> <td>0.0555</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>RDUO % BIOD</td> <td>18</td> <td>0.00</td> <td>0.02</td> <td>0.95</td> <td>0.6308</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>RDUO % BIOD</td> <td>18</td> <td>0.00</td> <td>0.05</td> <td>0.82</td> <td>0.0030</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>RDUO % BIOD</td> <td>18</td> <td>0.00</td> <td>0.04</td> <td>0.95</td> <td>0.7058</td> </tr> </tbody> </table> <p>Figura 17: Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para la variable "Concentración inicial de PNP". $p < 0,05$.</p> <p>Figura 18: Gráfico QQ-Plot de los residuos de la variable "Concentración inicial de PNP" para los 4 días analizados.</p>	DIA	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	1	RDUO % BIOD	18	0.00	0.02	0.88	0.0555	2	RDUO % BIOD	18	0.00	0.02	0.95	0.6308	3	RDUO % BIOD	18	0.00	0.05	0.82	0.0030	4	RDUO % BIOD	18	0.00	0.04	0.95	0.7058	<p>Análisis de la varianza</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>DIA</th> <th>Variable</th> <th>N</th> <th>R²</th> <th>R² Aj</th> <th>CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>RABS % BIOD</td> <td>18</td> <td>0.42</td> <td>0.18</td> <td>108.97</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo</td> <td>1.9E-03</td> <td>5</td> <td>3.7E-04</td> <td>1.77</td> <td>0.1939</td> </tr> <tr> <td>CONC_IN</td> <td>1.9E-03</td> <td>5</td> <td>3.7E-04</td> <td>1.77</td> <td>0.1939</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>2.5E-03</td> <td>12</td> <td>2.1E-04</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>4.4E-03</td> <td>17</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>DIA Variable N R² R² Aj CV</p> <p>2 RABS % BIOD 18 0.23 0.00 93.74</p> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo</td> <td>6.4E-04</td> <td>5</td> <td>1.3E-04</td> <td>0.70</td> <td>0.6320</td> </tr> <tr> <td>CONC_IN</td> <td>6.4E-04</td> <td>5</td> <td>1.3E-04</td> <td>0.70</td> <td>0.6320</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>2.2E-03</td> <td>12</td> <td>1.8E-04</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>2.8E-03</td> <td>17</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>DIA Variable N R² R² Aj CV</p> <p>3 RABS % BIOD 18 0.53 0.34 131.50</p> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo</td> <td>0.01</td> <td>5</td> <td>2.8E-03</td> <td>2.72</td> <td>0.0723</td> </tr> <tr> <td>CONC_IN</td> <td>0.01</td> <td>5</td> <td>2.8E-03</td> <td>2.72</td> <td>0.0723</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>0.01</td> <td>12</td> <td>1.0E-03</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>0.03</td> <td>17</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>DIA Variable N R² R² Aj CV</p> <p>4 RABS % BIOD 18 0.31 0.03 98.58</p> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo</td> <td>4.4E-03</td> <td>5</td> <td>8.9E-04</td> <td>1.10</td> <td>0.4116</td> </tr> <tr> <td>CONC_IN</td> <td>4.4E-03</td> <td>5</td> <td>8.9E-04</td> <td>1.10</td> <td>0.4116</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>0.01</td> <td>12</td> <td>8.1E-04</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>0.01</td> <td>17</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Figura 19: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de la variable "Concentración inicial de PNP". $p < 0,05$.</p>	DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	1	RABS % BIOD	18	0.42	0.18	108.97	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo	1.9E-03	5	3.7E-04	1.77	0.1939	CONC_IN	1.9E-03	5	3.7E-04	1.77	0.1939	Error	2.5E-03	12	2.1E-04			Total	4.4E-03	17				F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo	6.4E-04	5	1.3E-04	0.70	0.6320	CONC_IN	6.4E-04	5	1.3E-04	0.70	0.6320	Error	2.2E-03	12	1.8E-04			Total	2.8E-03	17				F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo	0.01	5	2.8E-03	2.72	0.0723	CONC_IN	0.01	5	2.8E-03	2.72	0.0723	Error	0.01	12	1.0E-03			Total	0.03	17				F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo	4.4E-03	5	8.9E-04	1.10	0.4116	CONC_IN	4.4E-03	5	8.9E-04	1.10	0.4116	Error	0.01	12	8.1E-04			Total	0.01	17				<p>Prueba de homocedasticidad</p> <p>Figura 20: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Concentración inicial de PNP" particionado por día.</p>
	DIA	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)																																																																																																																																																																			
1	RDUO % BIOD	18	0.00	0.02	0.88	0.0555																																																																																																																																																																				
2	RDUO % BIOD	18	0.00	0.02	0.95	0.6308																																																																																																																																																																				
3	RDUO % BIOD	18	0.00	0.05	0.82	0.0030																																																																																																																																																																				
4	RDUO % BIOD	18	0.00	0.04	0.95	0.7058																																																																																																																																																																				
DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV																																																																																																																																																																					
1	RABS % BIOD	18	0.42	0.18	108.97																																																																																																																																																																					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																																																																																																																																					
Modelo	1.9E-03	5	3.7E-04	1.77	0.1939																																																																																																																																																																					
CONC_IN	1.9E-03	5	3.7E-04	1.77	0.1939																																																																																																																																																																					
Error	2.5E-03	12	2.1E-04																																																																																																																																																																							
Total	4.4E-03	17																																																																																																																																																																								
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																																																																																																																																					
Modelo	6.4E-04	5	1.3E-04	0.70	0.6320																																																																																																																																																																					
CONC_IN	6.4E-04	5	1.3E-04	0.70	0.6320																																																																																																																																																																					
Error	2.2E-03	12	1.8E-04																																																																																																																																																																							
Total	2.8E-03	17																																																																																																																																																																								
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																																																																																																																																					
Modelo	0.01	5	2.8E-03	2.72	0.0723																																																																																																																																																																					
CONC_IN	0.01	5	2.8E-03	2.72	0.0723																																																																																																																																																																					
Error	0.01	12	1.0E-03																																																																																																																																																																							
Total	0.03	17																																																																																																																																																																								
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																																																																																																																																					
Modelo	4.4E-03	5	8.9E-04	1.10	0.4116																																																																																																																																																																					
CONC_IN	4.4E-03	5	8.9E-04	1.10	0.4116																																																																																																																																																																					
Error	0.01	12	8.1E-04																																																																																																																																																																							
Total	0.01	17																																																																																																																																																																								

Análisis: Se realizó la prueba de normalidad utilizando el método de Shapiro-Wilks "modificado", con un $p < 0,05$. Para todos los días excepto el tercero, el supuesto de normalidad fue aceptado debido a que el p-valor fue mayor a 0,05, aceptando la hipótesis nula de que las subpoblaciones tienen distribución normal para los días 1, 2 y 4. Visualmente el gráfico de QQ-Plot apoya esta idea debido a que los residuos se encuentran cercanos a la recta normal especialmente en los días dos y cuatro. En segundo lugar se puso a prueba el supuesto de homocedasticidad. Se llevó a cabo el análisis de la varianza ($p < 0,05$) de los residuos absolutos para los 4 días evaluados. El p-valor fue mayor a 0,05 en todos los días, por lo que se acepta la hipótesis nula de que las varianzas de las subpoblaciones son homogéneas. El gráfico de dispersión de los residuos vs predichos muestra distribuciones similares para los distintos grupos de la variable.

Shapiro-Wilks (modificado)

DIA	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
1	RDUO % Biodeg	15	0.00	0.28	0.92	0.3269
2	RDUO % Biodeg	15	0.00	0.24	0.95	0.7306
3	RDUO % Biodeg	15	0.00	0.21	0.90	0.2005
4	RDUO % Biodeg	15	0.00	0.11	0.94	0.5626

Figura 21: Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para la variable "Nivel de pH". $p < 0,05$.

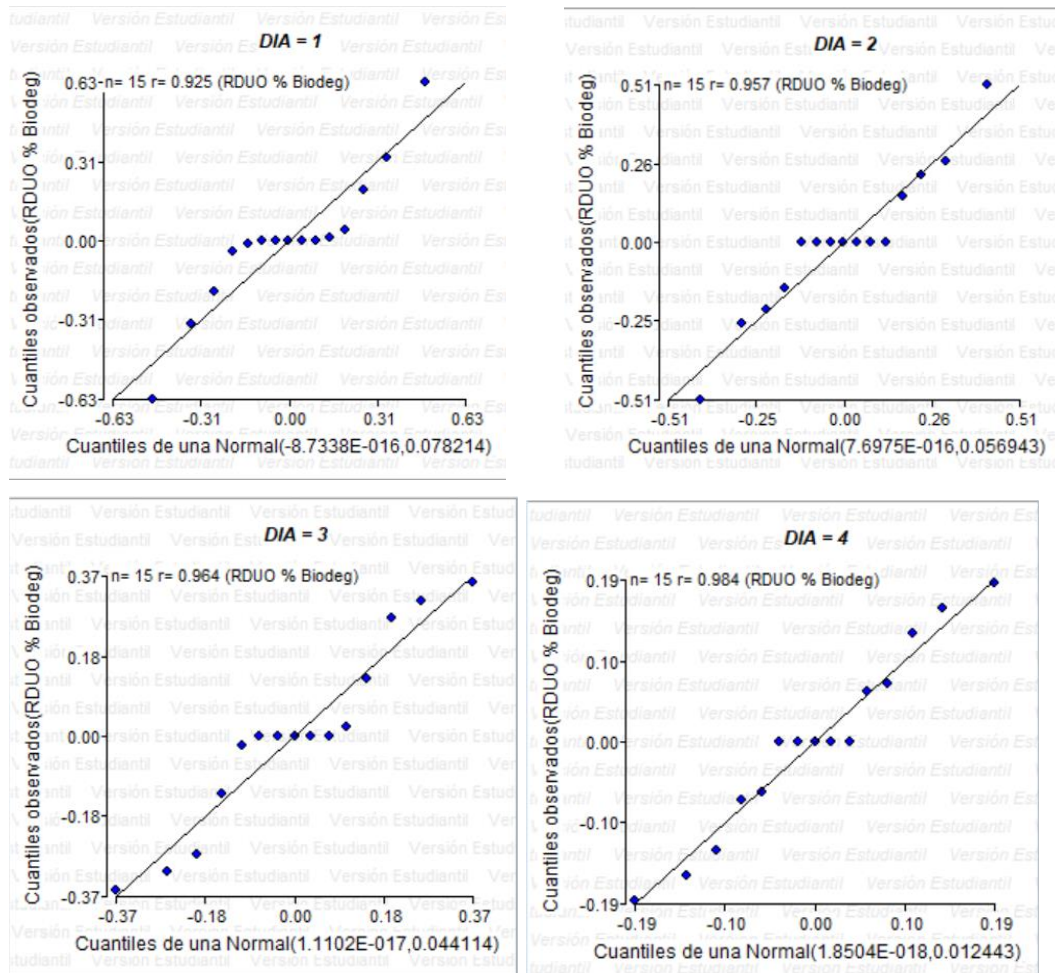


Figura 22: Gráfico QQ-Plot de los residuos de la variable "Nivel de pH" para los cuatro días analizados.

Análisis de la varianza

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	RABS % Biodeg	15	0.48	0.27	118.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.34	4	0.08	2.33	0.1272
Ph	0.34	4	0.08	2.33	0.1272
Error	0.36	10	0.04		
Total	0.70	14			

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2	RABS % Biodeg	15	0.41	0.17	107.25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.18	4	0.05	1.74	0.2176
Ph	0.18	4	0.05	1.74	0.2176
Error	0.27	10	0.03		
Total	0.45	14			

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	RABS % Biodeg	15	0.33	0.06	99.64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.10	4	0.03	1.22	0.3609
Ph	0.10	4	0.03	1.22	0.3609
Error	0.21	10	0.02		
Total	0.31	14			

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	RABS % Biodeg	15	0.23	0.00	93.69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	4	4.2E-03	0.73	0.5929
Ph	0.02	4	4.2E-03	0.73	0.5929
Error	0.06	10	0.01		
Total	0.07	14			

Figura 23: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de la variable "Nivel de pH". $p < 0,05$.

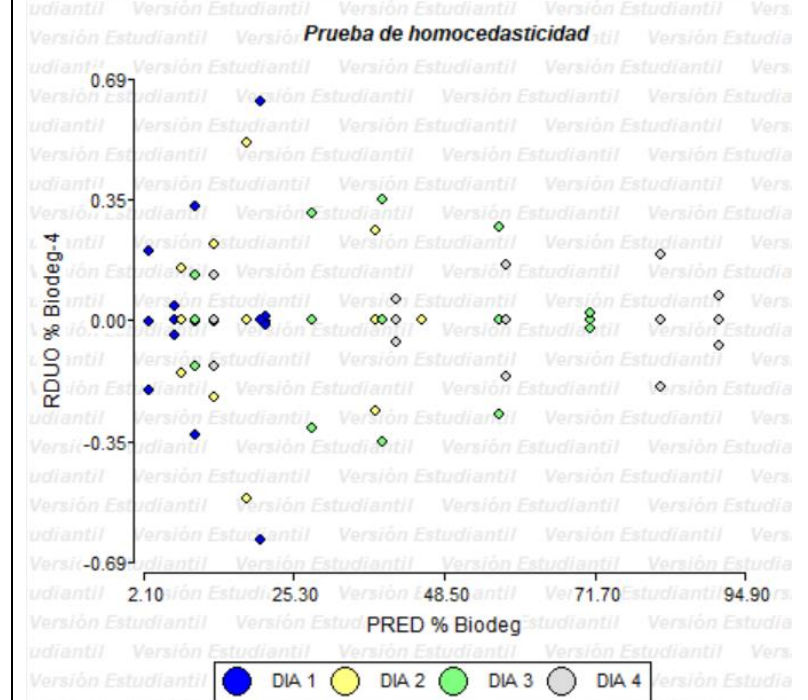


Figura 24: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Nivel de pH" particionado por día.

Análisis: Se efectuó la prueba de normalidad utilizando el método de Shapiro-Wilks "modificado", con un $p < 0,05$. El supuesto de normalidad fue aceptado debido a que el p-valor fue mayor a 0,05 para todos los días, aceptando la hipótesis nula de que las subpoblaciones tienen distribución normal. Visualmente, el gráfico de QQ-Plot afirma esta idea debido a que los residuos se encuentran cercanos a la recta normal. En segundo lugar se puso a prueba el supuesto de homocedasticidad. Se realizó el análisis de la varianza ($p < 0,05$) de los residuos absolutos para los 4 días evaluados. El p-valor fue mayor a 0,05 en todos los días, por lo que se acepta la hipótesis nula de que las varianzas de las subpoblaciones son homogéneas. El gráfico de dispersión de los residuos vs predichos muestra distribuciones similares para los distintos grupos de la variable a pesar de una leve forma acampanada.

Shapiro-Wilks (modificado)

DIA	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
1	RDUO % BIODEG	9	0.00	0.10	0.89	0.2845
2	RDUO % BIODEG	9	0.00	0.13	0.90	0.3770
3	RDUO % BIODEG	9	0.00	0.17	0.94	0.7330
4	RDUO % BIODEG	9	0.00	0.08	0.97	0.8950

Figura 25 : Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para la variable "Dosis de inóculo". $p < 0,05$.

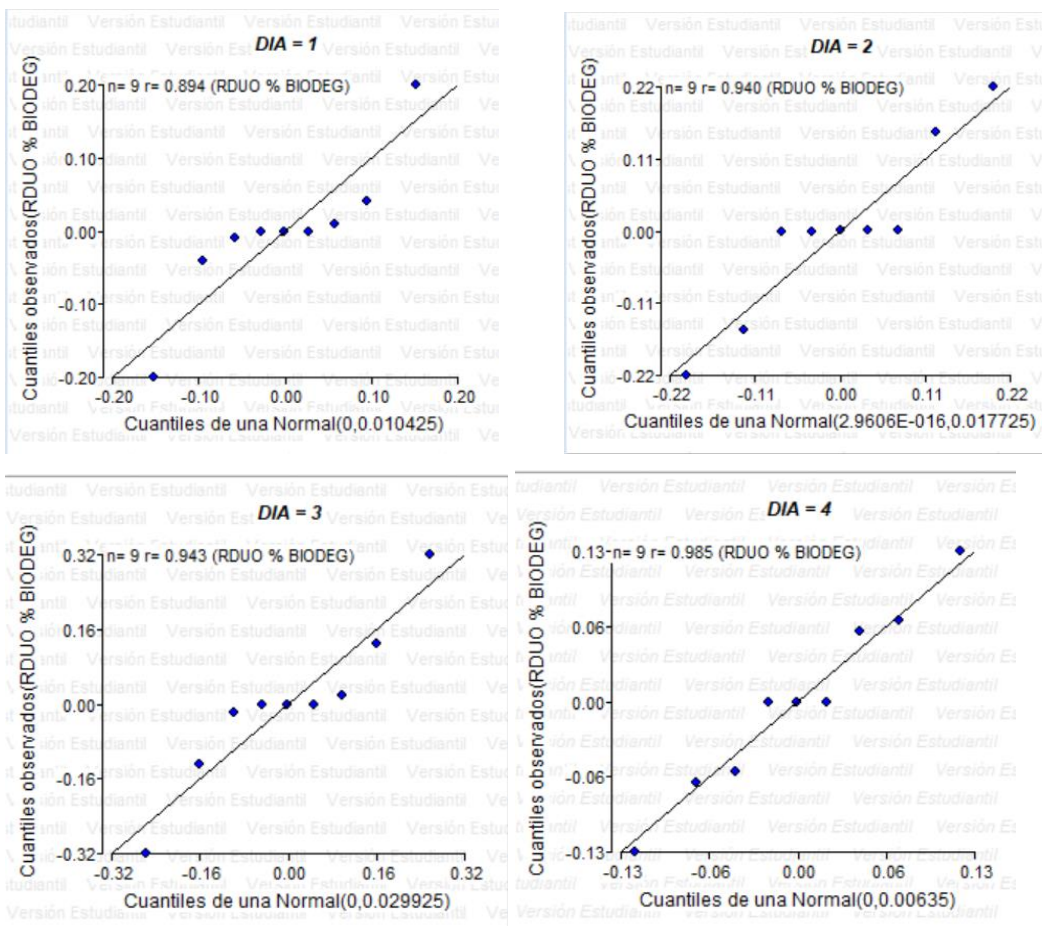


Figura 26: Gráfico QQ-Plot de los residuos de la variable "Dosis de inóculo" para los cuatro días analizados.

Análisis de la varianza

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	RABS % BIODEG	9	0.50	0.33	122.52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.03	2	0.01	3.00	0.1249
DOSIS_IN	0.03	2	0.01	3.00	0.1249
Error	0.03	6	4.6E-03		
Total	0.06	8			

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2	RABS % BIODEG	9	0.42	0.22	107.95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.03	2	0.02	2.14	0.1990
DOSIS_IN	0.03	2	0.02	2.14	0.1990
Error	0.05	6	0.01		
Total	0.08	8			

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	RABS % BIODEG	9	0.43	0.25	110.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.06	2	0.03	2.31	0.1804
DOSIS_IN	0.06	2	0.03	2.31	0.1804
Error	0.08	6	0.01		
Total	0.14	8			

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	RABS % BIODEG	9	0.18	0.00	91.95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.8E-03	2	1.9E-03	0.68	0.5430
DOSIS_IN	3.8E-03	2	1.9E-03	0.68	0.5430
Error	0.02	6	2.8E-03		
Total	0.02	8			

Figura 27: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de la variable "Dosis de inóculo". $p < 0,05$.

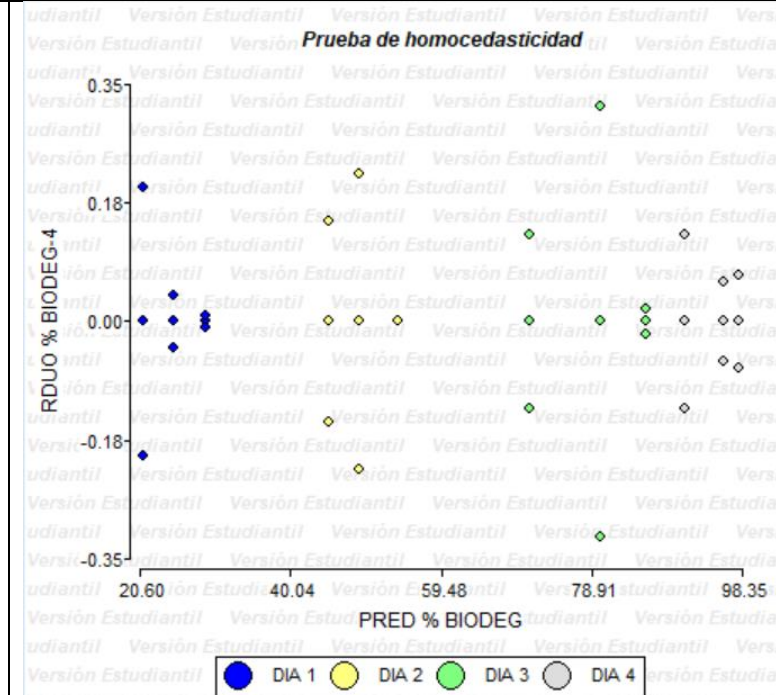


Figura 28: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Dosis de inóculo" particionado por día.

Análisis: Se realizó la prueba de normalidad utilizando el método de Shapiro-Wilks "modificado", con un $p < 0,05$. Para todos los días, el supuesto de normalidad fue aceptado debido a que el p-valor fue mayor a 0,05, aceptando la hipótesis nula de que las subpoblaciones tienen distribución normal. Visualmente el gráfico de QQ-Plot apoya esta idea debido a que los residuos se encuentran cercanos a la recta normal. En segundo lugar se puso a prueba el supuesto de homocedasticidad. Se llevó a cabo el análisis de la varianza ($p < 0,05$) de los residuos absolutos para los 4 días evaluados. El p-valor fue mayor a 0,05 en todos los días, por lo que se acepta la hipótesis nula de que las varianzas de las subpoblaciones son homogéneas. El gráfico de dispersión de los residuos vs predichos muestra distribuciones similares para los distintos grupos de la variable.

Shapiro-Wilks (modificado)

DIA	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
1	RDUO %_BIODEG	6	0.00	0.13	0.96	0.8427
2	RDUO %_BIODEG	6	0.00	0.17	0.93	0.6724
3	RDUO %_BIODEG	6	0.00	0.22	0.99	0.9830
4	RDUO %_BIODEG	6	0.00	0.09	0.98	0.9638

Figura 29: Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para la variable "Agua de río". $p < 0,05$.

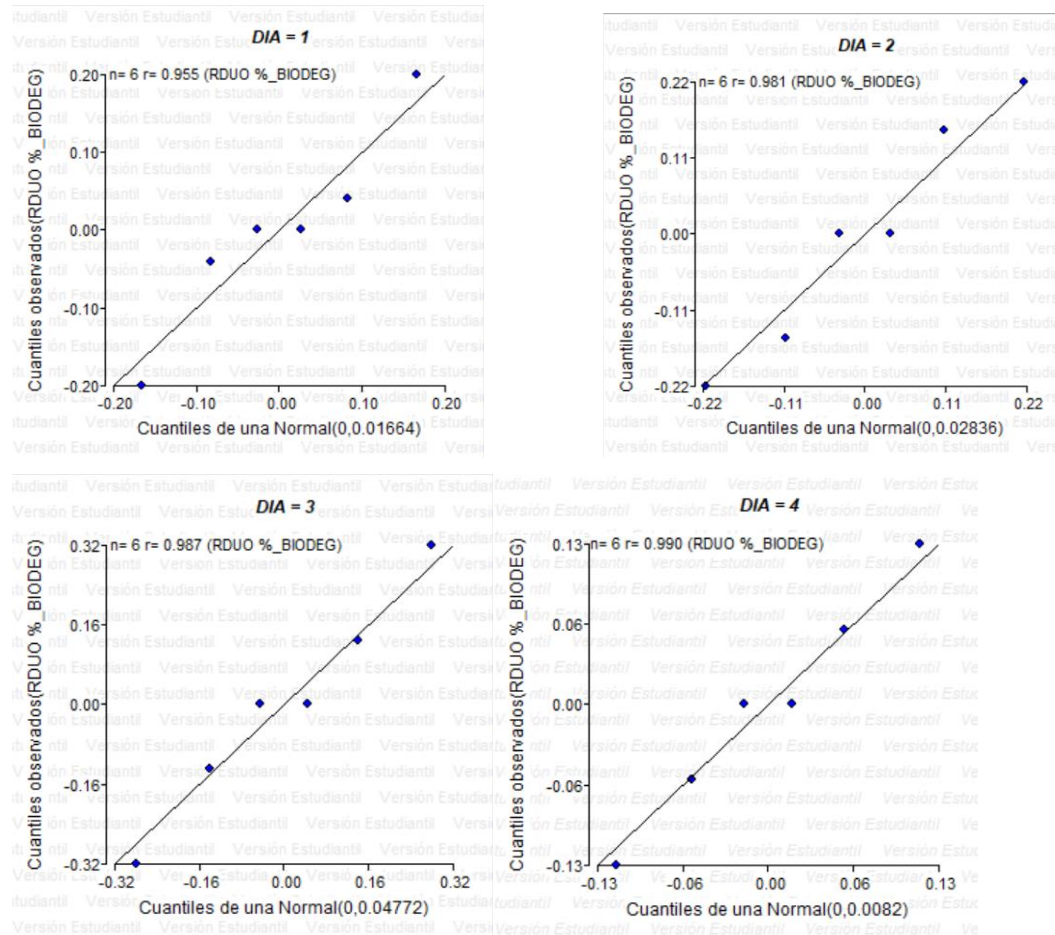


Figura 30: Gráfico QQ-Plot de los residuos de la variable "Agua de río" para los cuatro días analizados.

Análisis de la varianza

DIA	Variable	N	R²	R² Aj	CV
1	RABS %_BIODEG	6	0.38	0.23	104.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	1	0.02	2.46	0.1917
AGUA	0.02	1	0.02	2.46	0.1917
Error	0.03	4	0.01		
Total	0.04	5			

DIA	Variable	N	R²	R² Aj	CV
2	RABS %_BIODEG	6	0.06	0.00	88.14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.3E-03	1	3.3E-03	0.28	0.6268
AGUA	3.3E-03	1	3.3E-03	0.28	0.6268
Error	0.05	4	0.01		
Total	0.05	5			

DIA	Variable	N	R²	R² Aj	CV
3	RABS %_BIODEG	6	0.23	0.04	94.01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	1	0.02	1.21	0.3330
AGUA	0.02	1	0.02	1.21	0.3330
Error	0.08	4	0.02		
Total	0.10	5			

DIA	Variable	N	R²	R² Aj	CV
4	RABS %_BIODEG	6	0.19	0.00	92.29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.3E-03	1	3.3E-03	0.96	0.3835
AGUA	3.3E-03	1	3.3E-03	0.96	0.3835
Error	0.01	4	3.4E-03		
Total	0.02	5			

Figura 31: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de la variable "Agua de río". $p < 0,05$

Prueba de homocedasticidad

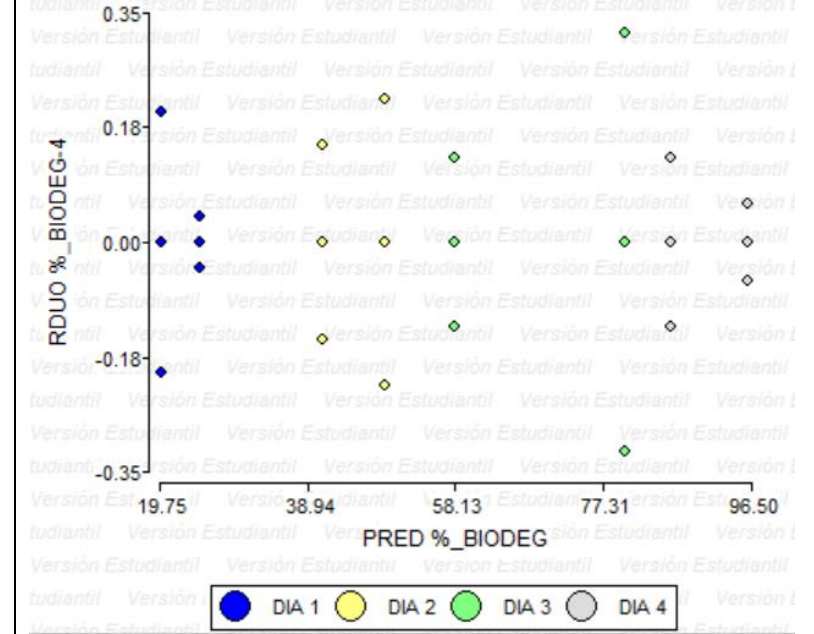


Figura 32: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Agua de río" particionado por día.

Análisis: Se efectuó la prueba de normalidad utilizando el método de Shapiro-Wilks "modificado", con un $p < 0,05$. El supuesto de normalidad fue aceptado debido a que el p-valor fue mayor a 0,05 para todos los días, aceptando la hipótesis nula de que las subpoblaciones tienen distribución normal. Visualmente, el gráfico de QQ-Plot afirma esta idea ya que los residuos se encuentran cercanos a la recta normal. En segundo lugar se puso a prueba el supuesto de homocedasticidad. Se realizó el análisis de la varianza ($p < 0,05$) de los residuos absolutos para los 4 días evaluados. El p-valor fue mayor a 0,05 en todos los días, por lo que se acepta la hipótesis nula de que las varianzas de las subpoblaciones son homogéneas. El gráfico de dispersión de los residuos vs predichos muestra distribuciones similares para los distintos grupos de la variable

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO RADICULA_mm	60	0.00	36.61	0.95	0.1420
RDUO PLUMULA mm	60	0.00	13.78	0.95	0.0741

Figura 33: Resultado de la prueba de normalidad - Shapiro-Wilks (modificado) para las variables "Longitud de plúmula" y "Longitud de raíz". $p < 0,05$.

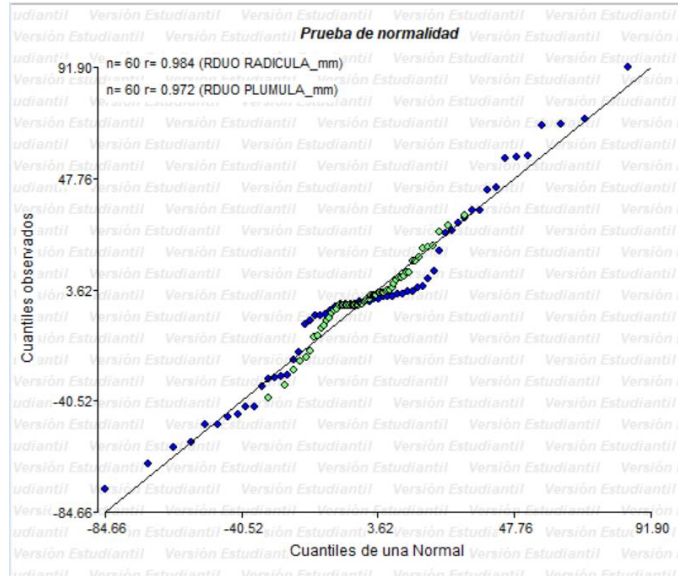


Figura 34: Gráfico QQ-Plot de los residuos de las variables "Longitud de plúmula" y "Longitud de raíz".

Análisis de la varianza

RABS RADICULA_mm

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS RADICULA mm	60	0.50	0.48	66.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	18246.74	2	9123.37	28.76	<0.0001
TRATAMIENTO	18246.74	2	9123.37	28.76	<0.0001
Error	18082.98	57	317.25		
Total	36329.72	59			

RABS PLUMULA_mm

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS PLUMULA mm	60	0.27	0.24	90.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1547.18	2	773.59	10.44	0.0001
TRATAMIENTO	1547.18	2	773.59	10.44	0.0001
Error	4223.01	57	74.09		
Total	5770.19	59			

Figura 35: Prueba de homocedasticidad - Análisis de la varianza de los residuos absolutos de las variables "Longitud de plúmula" y "Longitud de raíz". $p < 0,05$

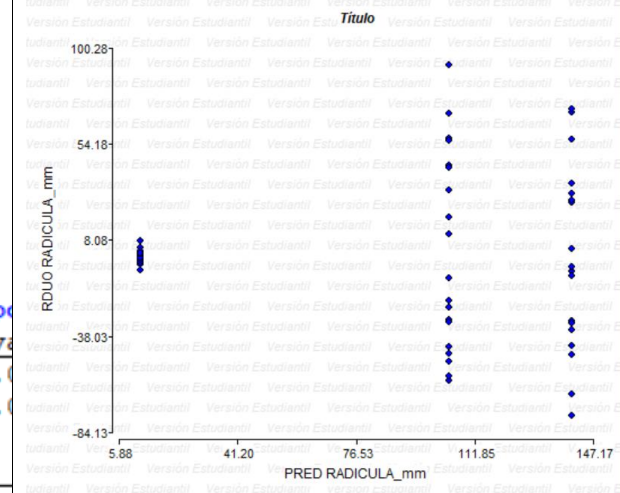


Figura 36: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Longitud de raíz".

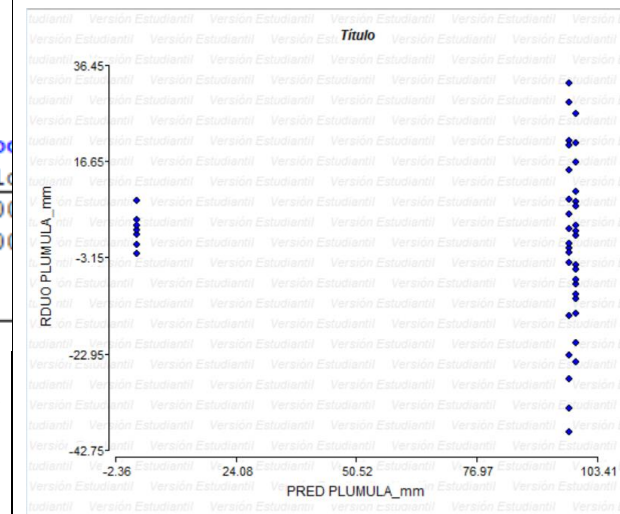


Figura 37: Prueba de homocedasticidad - Gráfico de dispersión de los residuos vs predichos. Variable "Longitud de plúmula".

Análisis: Se efectuó la prueba de normalidad utilizando el método de Shapiro-Wilks "modificado", con un $p < 0,05$. El supuesto de normalidad fue aceptado para ambas variables (longitud de plúmula y raíz en milímetros) debido a que el p-valor fue mayor a 0,05 para todos los días, aceptando la hipótesis nula de que las subpoblaciones tienen distribución normal. Visualmente, el gráfico de QQ-Plot afirma esta idea debido a que los residuos se encuentran cercanos a la recta normal para ambas variables. En segundo lugar se puso a prueba el supuesto de homocedasticidad. Se realizó el análisis de la varianza ($p < 0,05$) de los residuos absolutos para los 4 días evaluados. Debido a que el p-valor fue menor a 0,05 en todos los días, se rechaza la hipótesis nula de que las varianzas de las subpoblaciones son homogéneas. El gráfico de dispersión de los residuos vs predichos muestra marcados patrones de distribución vertical para los distintos grupos de las variables.

6.5 Análisis estadístico cuarta etapa “Búsqueda de condiciones óptimas para la biodegradación” – Comparaciones – Análisis de la varianza paramétrica: Prueba de Tukey & Análisis de la varianza no paramétrica: Prueba de Kruskal Wallis.

Tabla A 7: Análisis de la varianza correspondiente a la cuarta etapa del estudio "Búsqueda de condiciones óptimas para la biodegradación". Prueba de Tukey y prueba de Kruskal Wallis.

Variable evaluada	ANÁLISIS DE LA VARIANZA																																																																																																																																																																																																																																										
Concentración inicial de PNP	<p>PRUEBA DE TUKEY PARA VARIANZA PARAMÉTRICA. $p < 0,05$ DÍA 1, 2 Y 4</p> <p>Análisis de la varianza</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>DIA</th> <th>Variable</th> <th>N</th> <th>R²</th> <th>R² Aj</th> <th>CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>% BIOD</td> <td>18</td> <td>1.00</td> <td>1.00</td> <td>0.16</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo</td> <td>1112.50</td> <td>5</td> <td>222.50</td> <td>351315.79</td> <td><0.0001</td> </tr> <tr> <td>CONC_IN</td> <td>1112.50</td> <td>5</td> <td>222.50</td> <td>351315.79</td> <td><0.0001</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>0.01</td> <td>12</td> <td>6.3E-04</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>1112.51</td> <td>17</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.06902 Error: 0.0006 gl: 12</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CONC_IN</th> <th>Medias</th> <th>n</th> <th>E.E.</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50</td> <td>30.00</td> <td>3</td> <td>0.01</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>21.00</td> <td>3</td> <td>0.01</td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>18.00</td> <td>3</td> <td>0.01</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>12.00</td> <td>3</td> <td>0.01</td> <td>D</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>9.00</td> <td>3</td> <td>0.01</td> <td>E</td> </tr> <tr> <td>300</td> <td>7.00</td> <td>3</td> <td>0.01</td> <td>F</td> </tr> </tbody> </table> <p>DIA Variable N R² R² Aj CV 4 % BIOD 18 1.00 1.00 0.07</p> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo</td> <td>5554.23</td> <td>5</td> <td>1110.85</td> <td>456511.64</td> <td><0.0001</td> </tr> <tr> <td>CONC_IN</td> <td>5554.23</td> <td>5</td> <td>1110.85</td> <td>456511.64</td> <td><0.0001</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>0.03</td> <td>12</td> <td>2.4E-03</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>5554.25</td> <td>17</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.13529 Error: 0.0024 gl: 12</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CONC_IN</th> <th>Medias</th> <th>n</th> <th>E.E.</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50</td> <td>94.90</td> <td>3</td> <td>0.03</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>91.00</td> <td>3</td> <td>0.03</td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>78.00</td> <td>3</td> <td>0.03</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>65.00</td> <td>3</td> <td>0.03</td> <td>D</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>56.00</td> <td>3</td> <td>0.03</td> <td>E</td> </tr> <tr> <td>300</td> <td>47.00</td> <td>3</td> <td>0.03</td> <td>F</td> </tr> </tbody> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)</p> <p>Figura 38: Análisis de la varianza: Prueba de Tukey $p < 0,05$. Variable evaluada: Concentración inicial de PNP para los días 1, 2 y 4.</p>	DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	1	% BIOD	18	1.00	1.00	0.16	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo	1112.50	5	222.50	351315.79	<0.0001	CONC_IN	1112.50	5	222.50	351315.79	<0.0001	Error	0.01	12	6.3E-04			Total	1112.51	17				CONC_IN	Medias	n	E.E.		50	30.00	3	0.01	A	100	21.00	3	0.01	B	150	18.00	3	0.01	C	200	12.00	3	0.01	D	250	9.00	3	0.01	E	300	7.00	3	0.01	F	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo	5554.23	5	1110.85	456511.64	<0.0001	CONC_IN	5554.23	5	1110.85	456511.64	<0.0001	Error	0.03	12	2.4E-03			Total	5554.25	17				CONC_IN	Medias	n	E.E.		50	94.90	3	0.03	A	100	91.00	3	0.03	B	150	78.00	3	0.03	C	200	65.00	3	0.03	D	250	56.00	3	0.03	E	300	47.00	3	0.03	F	<p>PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS PARA VARIANZA NO PARAMÉTRICA. $p < 0,05$ DÍA 3</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>DIA</th> <th>Variable</th> <th>CONC</th> <th>IN</th> <th>N</th> <th>Medias</th> <th>D.E.</th> <th>Medianas</th> <th>H</th> <th>p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>% BIOD</td> <td>50</td> <td></td> <td>3</td> <td>85.00</td> <td>0.13</td> <td>85.00</td> <td>16.58</td> <td>0.0054</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>% BIOD</td> <td>100</td> <td></td> <td>3</td> <td>71.00</td> <td>0.02</td> <td>71.00</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>% BIOD</td> <td>150</td> <td></td> <td>3</td> <td>56.00</td> <td>0.02</td> <td>56.00</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>% BIOD</td> <td>200</td> <td></td> <td>3</td> <td>45.00</td> <td>0.02</td> <td>45.00</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>% BIOD</td> <td>250</td> <td></td> <td>3</td> <td>34.00</td> <td>0.02</td> <td>34.00</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>% BIOD</td> <td>300</td> <td></td> <td>3</td> <td>28.00</td> <td>0.01</td> <td>28.00</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Trat. Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CONC</th> <th>Ranks</th> <th>Grupos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>300</td> <td>2.00</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>5.00</td> <td>A B</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>8.00</td> <td>A B C</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>11.00</td> <td>B C D</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>14.00</td> <td>C D</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>17.00</td> <td>D</td> </tr> </tbody> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)</p> <p>Figura 39: Análisis de la varianza: Prueba de Kruskal Wallis. Variable evaluada: Concentración inicial de PNP para el día 3.</p>	DIA	Variable	CONC	IN	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	3	% BIOD	50		3	85.00	0.13	85.00	16.58	0.0054	3	% BIOD	100		3	71.00	0.02	71.00			3	% BIOD	150		3	56.00	0.02	56.00			3	% BIOD	200		3	45.00	0.02	45.00			3	% BIOD	250		3	34.00	0.02	34.00			3	% BIOD	300		3	28.00	0.01	28.00			CONC	Ranks	Grupos	300	2.00	A	250	5.00	A B	200	8.00	A B C	150	11.00	B C D	100	14.00	C D	50	17.00	D
	DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV																																																																																																																																																																																																																																					
1	% BIOD	18	1.00	1.00	0.16																																																																																																																																																																																																																																						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																																																																																																																																																																																																						
Modelo	1112.50	5	222.50	351315.79	<0.0001																																																																																																																																																																																																																																						
CONC_IN	1112.50	5	222.50	351315.79	<0.0001																																																																																																																																																																																																																																						
Error	0.01	12	6.3E-04																																																																																																																																																																																																																																								
Total	1112.51	17																																																																																																																																																																																																																																									
CONC_IN	Medias	n	E.E.																																																																																																																																																																																																																																								
50	30.00	3	0.01	A																																																																																																																																																																																																																																							
100	21.00	3	0.01	B																																																																																																																																																																																																																																							
150	18.00	3	0.01	C																																																																																																																																																																																																																																							
200	12.00	3	0.01	D																																																																																																																																																																																																																																							
250	9.00	3	0.01	E																																																																																																																																																																																																																																							
300	7.00	3	0.01	F																																																																																																																																																																																																																																							
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																																																																																																																																																																																																						
Modelo	5554.23	5	1110.85	456511.64	<0.0001																																																																																																																																																																																																																																						
CONC_IN	5554.23	5	1110.85	456511.64	<0.0001																																																																																																																																																																																																																																						
Error	0.03	12	2.4E-03																																																																																																																																																																																																																																								
Total	5554.25	17																																																																																																																																																																																																																																									
CONC_IN	Medias	n	E.E.																																																																																																																																																																																																																																								
50	94.90	3	0.03	A																																																																																																																																																																																																																																							
100	91.00	3	0.03	B																																																																																																																																																																																																																																							
150	78.00	3	0.03	C																																																																																																																																																																																																																																							
200	65.00	3	0.03	D																																																																																																																																																																																																																																							
250	56.00	3	0.03	E																																																																																																																																																																																																																																							
300	47.00	3	0.03	F																																																																																																																																																																																																																																							
DIA	Variable	CONC	IN	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p																																																																																																																																																																																																																																		
3	% BIOD	50		3	85.00	0.13	85.00	16.58	0.0054																																																																																																																																																																																																																																		
3	% BIOD	100		3	71.00	0.02	71.00																																																																																																																																																																																																																																				
3	% BIOD	150		3	56.00	0.02	56.00																																																																																																																																																																																																																																				
3	% BIOD	200		3	45.00	0.02	45.00																																																																																																																																																																																																																																				
3	% BIOD	250		3	34.00	0.02	34.00																																																																																																																																																																																																																																				
3	% BIOD	300		3	28.00	0.01	28.00																																																																																																																																																																																																																																				
CONC	Ranks	Grupos																																																																																																																																																																																																																																									
300	2.00	A																																																																																																																																																																																																																																									
250	5.00	A B																																																																																																																																																																																																																																									
200	8.00	A B C																																																																																																																																																																																																																																									
150	11.00	B C D																																																																																																																																																																																																																																									
100	14.00	C D																																																																																																																																																																																																																																									
50	17.00	D																																																																																																																																																																																																																																									
	<p>Análisis: En una comparación de medias de Tukey con un $p < 0,05$; las medias del porcentaje de biodegradación de PNP para las distintas concentraciones iniciales de PNP, presentaron en su totalidad diferencias estadísticamente significativas, para los días 1, 2 y 4 evaluados. En el caso del día tres, se realizó la prueba de Kruskal Wallis, para varianza no paramétrica, en ella se encontraron 4 grupos significativamente diferentes entre sí donde se encuentran tres niveles del tratamiento “Concentración inicial de PNP” en cada uno. Cada nivel, comparte grupo, es decir que no es estadísticamente diferente con dos niveles superiores y dos inferiores en una escala de 50 mg L⁻¹ de PNP.</p>																																																																																																																																																																																																																																										

Nivel de pH

PRUEBA DE TUKEY PARA VARIANZA PARAMÉTRICA. $p < 0,05$

Análisis de la varianza

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	% Biodeg 15	1.00	1.00	2.71	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	764.40	4	191.10	1745.21	<0.0001
Ph	764.40	4	191.10	1745.21	<0.0001
Error	1.10	10	0.11		
Total	765.50	14			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.88920

Error: 0.1095 gl: 10

Ph Medias n E.E.

n	E.E.	Letter
7	21.00 3 0.19	A
9	20.00 3 0.19	B
11	10.00 3 0.19	C
5	7.00 3 0.19	D
3	3.00 3 0.19	E

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

Figura 40: Análisis de la varianza: Prueba de Tukey $p < 0,05$. Variable evaluada: Nivel de pH.

Análisis: En una comparación de medias de Tukey con un $p < 0,05$; las medias del porcentaje de biodegradación de PNP para los distintos niveles de pH, presentaron en su totalidad diferencias estadísticamente significativas, para todos los días evaluados.

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2	% Biodeg 15	1.00	1.00	1.16	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3147.60	4	786.90	9870.80	<0.0001
Ph	3147.60	4	786.90	9870.80	<0.0001
Error	0.80	10	0.08		
Total	3148.40	14			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.75871

Error: 0.0797 gl: 10

Ph Medias n E.E.

n	E.E.	Letter
7	45.00 3 0.16	A
9	38.00 3 0.16	B
11	18.00 3 0.16	C
5	13.00 3 0.16	D
3	8.00 3 0.16	E

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	% Biodeg 15	1.00	1.00	0.61	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6870.00	4	1717.50	27809.26	<0.0001
Ph	6870.00	4	1717.50	27809.26	<0.0001
Error	0.62	10	0.06		
Total	6870.62	14			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.66780

Error: 0.0618 gl: 10

Ph Medias n E.E.

n	E.E.	Letter
7	71.00 3 0.14	A
9	57.00 3 0.14	B
11	39.00 3 0.14	C
5	28.00 3 0.14	D
3	10.00 3 0.14	E

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	% Biodeg 15	1.00	1.00	0.23	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11922.00	4	2980.50	171096.44	<0.0001
Ph	11922.00	4	2980.50	171096.44	<0.0001
Error	0.17	10	0.02		
Total	11922.17	14			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.35466

Error: 0.0174 gl: 10

Ph Medias n E.E.

n	E.E.	Letter
7	91.00 3 0.08	A
9	82.00 3 0.08	B
11	58.00 3 0.08	C
5	41.00 3 0.08	D
3	13.00 3 0.08	E

Dosis de inóculo

PRUEBA DE TUKEY PARA VARIANZA PARAMÉTRICA. $p < 0,05$

Análisis de la varianza

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	% BIODG 9	1.00	1.00	0.47	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	96.00	2	48.00	3453.24	<0.0001
DOSIS_IN	96.00	2	48.00	3453.24	<0.0001
Error	0.08	6	0.01		
Total	96.08	8			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.29536

Error: 0.0139 gl: 6

DOSIS IN Medias n E.E.

n	E.E.	Letter
5	29.00 3 0.07	A
3	25.00 3 0.07	B
1	21.00 3 0.07	C

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

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2	% BIODG 9	1.00	1.00	0.31	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	122.00	2	61.00	2581.10	<0.0001
DOSIS_IN	122.00	2	61.00	2581.10	<0.0001
Error	0.14	6	0.02		
Total	122.14	8			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.38513

Error: 0.0236 gl: 6

DOSIS IN Medias n E.E.

n	E.E.	Letter
5	54.00 3 0.09	A
3	49.00 3 0.09	B
1	45.00 3 0.09	C

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	% BIODG 9	1.00	1.00	0.25	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	342.00	2	171.00	4285.71	<0.0001
DOSIS_IN	342.00	2	171.00	4285.71	<0.0001
Error	0.24	6	0.04		
Total	342.24	8			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.50042

Error: 0.0399 gl: 6

DOSIS IN Medias n E.E.

n	E.E.	Letter
5	86.00 3 0.12	A
3	80.00 3 0.12	B
1	71.00 3 0.12	C

DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	% BIODG 9	1.00	1.00	0.10	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	78.00	2	39.00	4606.30	<0.0001
DOSIS_IN	78.00	2	39.00	4606.30	<0.0001
Error	0.05	6	0.01		
Total	78.05	8			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.23052

Error: 0.0085 gl: 6

DOSIS IN Medias n E.E.

n	E.E.	Letter
5	98.00 3 0.05	A
3	96.00 3 0.05	B
1	91.00 3 0.05	C

Figura 41: Análisis de la varianza: Prueba de Tukey $p < 0,05$. Variable evaluada: Dosis de inóculo.

Análisis: En una comparación de medias de Tukey con un $p < 0,05$; las medias del porcentaje de biodegradación de PNP para las distintas dosis de inóculo, presentaron en su totalidad diferencias estadísticamente significativas, para todos los días evaluados.

6.6 Análisis estadístico quinta etapa “Pruebas de viabilidad/fitotoxicidad”– Comparaciones – Análisis de la varianza.

Tabla A 8: Análisis de la varianza correspondiente a la quinta etapa del estudio "Pruebas de viabilidad/fitotoxicidad". Prueba de Tukey y Prueba de Kruskal Wallis.

<p>Efecto de matriz ambiental: Agua de río</p>	<p>PRUEBA DE TUKEY PARA VARIANZA PARAMÉTRICA. $p < 0,05$</p> <p>Análisis de la varianza</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>DIA</th> <th>Variable</th> <th>N</th> <th>R²</th> <th>R² Aj</th> <th>CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>% BIODEG</td> <td>6</td> <td>1.00</td> <td>1.00</td> <td>0.64</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo</td> <td>37.50</td> <td>1</td> <td>37.50</td> <td>1802.88</td> <td><0.0001</td> </tr> <tr> <td>AGUA</td> <td>37.50</td> <td>1</td> <td>37.50</td> <td>1802.88</td> <td><0.0001</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>0.08</td> <td>4</td> <td>0.02</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>37.58</td> <td>5</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.32695 Error: 0.0208 gl: 4 AGUA Medias n E.E.</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>DE</th> <th>n</th> <th>E.E.</th> <th>Letra</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DE</td> <td>25.00</td> <td>3 0.08</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>RIO</td> <td>20.00</td> <td>3 0.08</td> <td>B</td> </tr> </tbody> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)</p> <p><i>Figura 42: Análisis de la varianza: Prueba de Tukey $p < 0,05$. Variable evaluada: Efecto de matriz ambiental (Agua de río).</i></p> <p>Análisis: En una comparación de medias de Tukey con un $p < 0,05$; las medias del porcentaje de biodegradación de PNP para el efecto de la matriz ambiental (agua de río) en comparación con el control, presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al control, para todos los días evaluados.</p>	DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	1	% BIODEG	6	1.00	1.00	0.64	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo	37.50	1	37.50	1802.88	<0.0001	AGUA	37.50	1	37.50	1802.88	<0.0001	Error	0.08	4	0.02			Total	37.58	5				DE	n	E.E.	Letra	DE	25.00	3 0.08	A	RIO	20.00	3 0.08	B																																		
DIA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV																																																																																				
1	% BIODEG	6	1.00	1.00	0.64																																																																																				
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																																																				
Modelo	37.50	1	37.50	1802.88	<0.0001																																																																																				
AGUA	37.50	1	37.50	1802.88	<0.0001																																																																																				
Error	0.08	4	0.02																																																																																						
Total	37.58	5																																																																																							
DE	n	E.E.	Letra																																																																																						
DE	25.00	3 0.08	A																																																																																						
RIO	20.00	3 0.08	B																																																																																						
<p>Ensayo de fitotoxicidad: Longitud de plúmula y radícula.</p>	<p>PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS PARA VARIANZA NO PARAMÉTRICA. $p < 0,05$</p> <p>Prueba de Kruskal Wallis</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Variable</th> <th>TRATAMIENTO</th> <th>N</th> <th>Medias</th> <th>D.E.</th> <th>Medianas</th> <th>H</th> <th>p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RADICULA_mm</td> <td>CONTROL</td> <td>20</td> <td>140.75</td> <td>43.11</td> <td>135.00</td> <td>41.83</td> <td><0.0001</td> </tr> <tr> <td>RADICULA_mm</td> <td>Sin tratar</td> <td>20</td> <td>12.30</td> <td>3.08</td> <td>12.00</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RADICULA mm</td> <td>TRATADO</td> <td>20</td> <td>104.10</td> <td>47.89</td> <td>88.50</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Trat. Ranks</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Trat.</th> <th>Ranks</th> <th>Letra</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sin tratar</td> <td>10.50</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>TRATADO</td> <td>36.15</td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>CONTROL</td> <td>44.85</td> <td>B</td> </tr> </tbody> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)</p> <p><i>Figura 43: Análisis de la varianza no paramétrica: Prueba de Kruskal Wallis. Variable evaluada: Longitud de plúmula en ensayo de fitotoxicidad.</i></p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Variable</th> <th>TRATAMIENTO</th> <th>N</th> <th>Medias</th> <th>D.E.</th> <th>Medianas</th> <th>H</th> <th>p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PLUMULA mm</td> <td>CONTROL</td> <td>20</td> <td>98.60</td> <td>13.41</td> <td>100.00</td> <td>39.35</td> <td><0.0001</td> </tr> <tr> <td>PLUMULA mm</td> <td>Sin tratar</td> <td>20</td> <td>2.45</td> <td>3.22</td> <td>0.00</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>PLUMULA mm</td> <td>TRATADO</td> <td>20</td> <td>97.15</td> <td>19.98</td> <td>97.00</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Trat. Ranks</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Trat.</th> <th>Ranks</th> <th>Letra</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sin tratar</td> <td>10.50</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>CONTROL</td> <td>40.43</td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>TRATADO</td> <td>40.58</td> <td>B</td> </tr> </tbody> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)</p> <p><i>Figura 44: Análisis de la varianza no paramétrica: Prueba de Kruskal Wallis. Variable evaluada: Longitud de radícula en ensayo de fitotoxicidad.</i></p> <p>Análisis: En una comparación de medias con el método “Kruskal Wallis” para varianzas no paramétricas, las medias de la longitud de plúmula y radícula para los tratamientos “Tratado” y “Control” no mostraron diferencias estadísticamente significativas para un $p < 0,05$. Sin embargo si lo hicieron para el tratamiento “Sin tratar”.</p>	Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	RADICULA_mm	CONTROL	20	140.75	43.11	135.00	41.83	<0.0001	RADICULA_mm	Sin tratar	20	12.30	3.08	12.00			RADICULA mm	TRATADO	20	104.10	47.89	88.50			Trat.	Ranks	Letra	Sin tratar	10.50	A	TRATADO	36.15	B	CONTROL	44.85	B	Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	PLUMULA mm	CONTROL	20	98.60	13.41	100.00	39.35	<0.0001	PLUMULA mm	Sin tratar	20	2.45	3.22	0.00			PLUMULA mm	TRATADO	20	97.15	19.98	97.00			Trat.	Ranks	Letra	Sin tratar	10.50	A	CONTROL	40.43	B	TRATADO	40.58	B
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p																																																																																		
RADICULA_mm	CONTROL	20	140.75	43.11	135.00	41.83	<0.0001																																																																																		
RADICULA_mm	Sin tratar	20	12.30	3.08	12.00																																																																																				
RADICULA mm	TRATADO	20	104.10	47.89	88.50																																																																																				
Trat.	Ranks	Letra																																																																																							
Sin tratar	10.50	A																																																																																							
TRATADO	36.15	B																																																																																							
CONTROL	44.85	B																																																																																							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p																																																																																		
PLUMULA mm	CONTROL	20	98.60	13.41	100.00	39.35	<0.0001																																																																																		
PLUMULA mm	Sin tratar	20	2.45	3.22	0.00																																																																																				
PLUMULA mm	TRATADO	20	97.15	19.98	97.00																																																																																				
Trat.	Ranks	Letra																																																																																							
Sin tratar	10.50	A																																																																																							
CONTROL	40.43	B																																																																																							
TRATADO	40.58	B																																																																																							