



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**UNIDAD DE POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL**

Proyecto de Investigación previa la  
obtención del Grado Académico de  
Magíster en Gestión Ambiental.

**TEMA**

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS CON  
POTENCIAL BIORREMEDIADORA PROVENIENTES DE SUELOS AGRÍCOLAS  
CONTAMINADOS CON PESTICIDAS DE ORIGEN ORGANOFOSFORADOS, AÑO 2019.

**AUTOR**

ING. ANTONIO FRANCISCO MENDOZA LEON

**DIRECTOR**

DR. HAYRON FABRICIO CANCHIGNIA MARTÍNEZ. PhD

**QUEVEDO - ECUADOR**

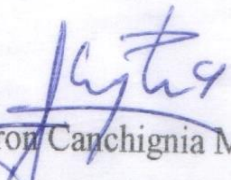
**2020**

## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD, en calidad de Director de Proyecto de Investigación, previa la obtención del grado Académico de Magister en Gestión Ambiental.

### **CERTIFICA**

Que el Ing. Antonio Francisco Mendoza León autor del Proyecto de Investigación titulado: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS CON POTENCIAL BIORREMEDIADORA PROVENIENTES DE SUELOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS CON PESTICIDAS DE ORIGEN ORGANOFOSFORADOS, AÑO 2019, ha sido revisada en todos sus componentes por lo que se autoriza su presentación entre el tribunal respectivo.

  
Ing. Hayron Canchignia Martínez PhD.

**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **ANTONIO FRANCISCO MENDOZA LEON** declaro que el trabajo de investigación aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo de investigación, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.



---

Ing. Antonio Francisco Mendoza León

## **DEDICATORIA**

Este proyecto de investigación está dedicado a:

A Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y determinación en mi vida para cumplir con mis metas y objetivos propuestos y con amor han estado conmigo hasta el día de hoy.

A mis padres José Pedro Mendoza Vines y Sergia Apolinaria León Reina (†), quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, valentía y muchos valores de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mi hija Shirley Mendoza Gómez, quien con su estimulación siempre ha estado a mi lado con afecto y tu cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo, de mis ganas de buscar lo mejor para ti. Aun a tu corta edad, me has enseñado y me sigues enseñando muchas cosas de esta vida. Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce y no amargo de la vida, fuiste mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto de investigación.

## AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación primeramente me gustaría agradecer a Dios por bendecirme y hacer realidad este sueño anhelado.

A la **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO** por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A mi Director del proyecto de investigación, Dr. Hayron Canchignia, por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación ha logrado que pueda culminar mis estudios con éxito.

También me gustaría agradecer a todos los catedráticos que me brindaron sus grandes conocimientos durante toda mi carrera profesional.

De igual forma agradecer al grupo de colegas y compañeros de la Maestría; Ing. William Quintero, Biol. Walter Baque, Ing. Freddy Cedeño, Abg.<sup>da</sup>. Nabila Caceres y Abg. Patricio Zambrano, por su amistad y compañerismo que brindaron dentro del salón de clases. A si también agradecer a Docentes Investigadores de la Unidad de Investigación de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Dra. Silvia Saucedo, Dr. Hayron Canchignia, Dr. Nicolas Cruz, Dr. Enrique Nieto, Dr. Jaime Morante.

A su vez me gustaría agradecer al grupo de amigos investigadores en especial al Ing. Angel Cedeño, Ing. Maholy Loza, Ing. Víctor García. Ing. Jorge Rodríguez, Ing. Luis Vera, Ing. Víctor Tubay, Ing. Cristhian Macías, Ing. Fernando Quintana, Ing. Rolando Zurita. equipo de trabajo que compartieron y aportaron con sus conocimientos en el proceso de la investigación en el departamento del Laboratorio de Biotecnología de Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en las ares de Cultivo de Tejido Vegetales, Microbiología y Biología Molecular.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional y me gustaría agradecer su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo, otras en mis recuerdos y mi corazón.

## PRÓLOGO

Los compuestos organofosforados son los más empleados en la agricultura intensiva, ocasionando daños a la salud y al ambiente al ser vertidos en los afluentes y al suelo de forma intencionada. El empleo de medidas de mitigación ayuda a mejorar las condiciones ambientales que han sufrido un deterioro por el uso inadecuado de agroquímicos, que en su gran mayoría se acumulan en el suelo. Estas medidas de mitigación están sujetas a factores como las alteraciones en el pH del suelo y el efecto residual de las sustancias tóxicas, por lo que su aplicabilidad es restringida. Las bacterias biorremediadoras son una de las alternativas de atenuación más empleadas en el campo agrícola, gracias a características biológicas que le permiten resistir altas concentraciones de compuestos tóxicos empleándolos como única fuente de energía.

Es por ello que existe una creciente necesidad de incluir en el manejo del recurso suelo a este tipo de organismos, cuya aplicación va desde prácticas productivas hasta la bioremediación, devolviéndole a la tierra su capacidad degradadora y nutrimental como soporte en un sistema de producción agrícola sostenible. Lamentablemente poco o nada se conoce sobre genotipos locales de microorganismos con estos atributos remediadores y de recuperación, actividad que queda como materia pendiente a las OGs y ONGs involucradas en el desarrollo del sector agrícola local y nacional.

En el presente documento se encuentra plasmada información relevante sobre la identificación y caracterización molecular de cuatro cepas de microorganismos con un prometedor potencial biorremediador, razón por la cual se sitúa a esta investigación como una importante contribución en esta área del conocimiento, sobre todo por la elevada eficiencia de estos microorganismos en la remoción de partículas contaminantes del suelo a corto plazo

Finalmente, se conocerá de primera mano cómo las modernas herramientas biotecnológicas contribuyeron a la consecución de los objetivos planteados en este proyecto y a la obtención de un prometedor producto con efectos biorremediador



---

Nicolás Javier Cruz Rosero, PhD.

## RESUMEN

El incremento en el uso de pesticidas organofosforados en las prácticas agrícolas a través de los últimos años, ha generado una serie de problemas ambientales. Estos compuestos tienden a bioacumularse a través de las cadenas tróficas presentando altos niveles de toxicidad desencadenando potenciales riesgos para la salud de las especies que son expuestas a este tipo de sustancias. En esta investigación se recuperaron diferentes cultivos bacterianos adaptados a concentraciones elevadas de pesticidas, se realizaron pruebas bioquímicas entre las que se incluyeron catalasa y ureasa con la finalidad de determinar el mecanismo de acción directo ante las alteraciones químicas del suelo. Las pruebas de caracterización molecular se realizaron empleando ERIC PCR que permitió la clasificación y distinción de los diferentes grupos genéticos. Entre los resultados se destaca la eficiencia en degradación de urea fosforo y potasio, elementos muy importantes para las funciones fisiológicas de las plantas, también se pudo determinar las curvas de descontaminación que alcanzan valores reducidos a los 30 días después de la inoculación bacteriana en los medios contagiados medidos a una longitud de onda de 600 nm. Esta investigación permite aportar información relevante de interés en la biorremediación de suelos contaminados con pesticidas organofosforados que afectan a la salud humana y generan un desequilibrio en los ecosistemas acuáticos.

**Palabras clave:** DDT, medio ambiente, organoclorado, bioestimulante, degradación, insecticidas.

## ABSTRACT

The increase in the use of organophosphate pesticides in agricultural practices in recent years has generated a series of environmental problems. These compounds tend to bioaccumulate through the food chains, presenting high levels of toxicity, triggering potential health risks for species that are exposed to this type of substance. In this investigation, different bacterial cultures adapted to high concentrations of pesticides were recovered, biochemical tests were carried out, including catalase and urease in order to determine the mechanism of direct action against chemical alterations in the soil. Molecular characterization tests were performed using ERIC PCR that allowed the classification and distinction of the different genetic groups. Among the results, the degradation efficiency of urea phosphate and potassium stands out, very important elements for the physiological functions of plants, it was also possible to determine the decontamination curves that reach reduced values 30 days after bacterial inoculation in the media. infected measured at a wavelength of 600 nm. This research allows us to provide relevant information of interest in the bioremediation of soils contaminated with organophosphate pesticides that affect human health and generate an imbalance in aquatic ecosystems.

**Keywords:** DDT, environment, organochlorine, biostimulant, degradation, insecticides.



## TABLA DE CONTENIDO

|                                                             |      |
|-------------------------------------------------------------|------|
| PORTADA.....                                                | i    |
| CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO .....             | ii   |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS .....           | iii  |
| DEDICATORIA .....                                           | iv   |
| AGRADECIMIENTO .....                                        | v    |
| PRÓLOGO.....                                                | vi   |
| RESUMEN .....                                               | vii  |
| ABSTRACT.....                                               | viii |
| TABLA DE CONTENIDO .....                                    | ix   |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                      | xiv  |
| INTRODUCCIÓN .....                                          | xvii |
| <br>                                                        |      |
| CAPÍTULO I MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN .....       | 1    |
| 1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA ..... | 2    |
| 1.2. LAS BACTERIAS CON CAPACIDAD BIOREMEDIADORAS .....      | 4    |
| 1.3. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA .....              | 5    |
| 1.4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....                        | 6    |
| 1.3.1. Problema general.....                                | 6    |
| 1.3.2. Problemas derivados .....                            | 6    |
| 1.4. Delimitación del problema.....                         | 6    |
| 1.5. OBJETIVOS .....                                        | 7    |
| 1.5.1. General .....                                        | 7    |
| 1.5.2. Específicos .....                                    | 7    |
| 1.6. JUSTIFICACIÓN .....                                    | 8    |

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN .....                                 | 9  |
| 2.1. FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL .....                                                | 10 |
| 2.1.1. Caracterización morfológica .....                                            | 10 |
| 2.1.2. Caracterización Molecular .....                                              | 10 |
| 2.1.3. Biorremediación.....                                                         | 10 |
| 2.1.4. Pesticida .....                                                              | 11 |
| 2.1.5. Organofosforado .....                                                        | 11 |
| 2.1.6. Medio de cultivo .....                                                       | 11 |
| 2.1.7. Microorganismos .....                                                        | 11 |
| 2.1.8. Identificación microbiana .....                                              | 12 |
| 2.1.9. Bacteria .....                                                               | 12 |
| 2.1.10. Hongos .....                                                                | 12 |
| 2.1.11. Biodep .....                                                                | 13 |
| 2.1.12. Plaguicidas .....                                                           | 13 |
| 2.1.13. Suelo.....                                                                  | 13 |
| 2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....                                                   | 14 |
| 2.2.1. Degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas. .... | 14 |
| 2.2.2. Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos. | 14 |
| 2.3.1. Constitución Política del Ecuador (2008) .....                               | 15 |
| 2.3.2. Ley de Gestión Ambiental (2004).....                                         | 15 |
| 2.3.3. Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (2015)... | 17 |
| CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....                                   | 18 |
| 3.1. LOCALIZACIÓN.....                                                              | 19 |
| 3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN .....                                                    | 19 |
| 3.2.1. Experimental .....                                                           | 19 |

|        |                                                                               |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.   | MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....                                                 | 19 |
| 3.3.1. | Inductivo .....                                                               | 19 |
| 3.3.2. | Deductivo .....                                                               | 19 |
| 3.3.3. | Observación científica.....                                                   | 20 |
| 3.4.   | MUESTRA .....                                                                 | 20 |
| 3.5.   | FUENTES DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN.....                                    | 20 |
| 3.5.1. | Fuentes primarias .....                                                       | 20 |
| 3.5.2. | Fuentes secundarias.....                                                      | 20 |
| 3.6.   | INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN .....                                            | 21 |
| 3.6.1. | Ficha de laboratorio .....                                                    | 21 |
| 3.6.2. | Ficha de monitoreo.....                                                       | 21 |
| 3.6.3. | Material virtual.....                                                         | 21 |
| 3.7.   | PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN .....                              | 21 |
| 3.7.1. | Identificación de los microorganismos aislados .....                          | 21 |
| 3.7.2. | Caracterización morfológica.....                                              | 22 |
| 3.8.   | CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA .....                                              | 23 |
| 3.8.1. | Prueba de ureasa.....                                                         | 23 |
| 3.8.2. | Prueba de fosforo .....                                                       | 23 |
| 3.8.3. | Prueba de potasio .....                                                       | 23 |
| 3.8.4. | Prueba de catalasa .....                                                      | 23 |
| 3.8.5. | Prueba de proteasa .....                                                      | 24 |
| 3.8.6. | Prueba de tinción Gram.....                                                   | 24 |
| 3.8.7. | Clasificación microbiana en diferentes concentraciones de contaminantes ..... | 24 |
| 3.8.8. | Velocidad de crecimiento en medios contaminados .....                         | 25 |
| 3.9.   | DEGRADACIÓN DE PESTICIDAS. ....                                               | 25 |
| 3.9.1. | Caracterización molecular.....                                                | 25 |

|                                                                                        |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 3.9.2. Generación de árbol filogenético (Dendograma).....                              | 26     |
| 3.9.3. Conservación en banco de germoplasma .....                                      | 26     |
| 3.10. diseño de la investigación .....                                                 | 27     |
| 3.10.1. Diseño para evaluar los caracteres .....                                       | 27     |
| 3.10.2. Diseño para Determinar la capacidad biodegradadoras .....                      | 27     |
| 3.10.3. Obtener un banco de germoplasma de bacterias .....                             | 28     |
| 3.11. MANEJO DEL EXPERIMENTO .....                                                     | 28     |
| 3.11.1. Aislamiento de bacterias .....                                                 | 28     |
| 3.11.2. Identificación .....                                                           | 28     |
| 3.11.3. Aislamiento de bacterias .....                                                 | 28     |
| 3.11.4. Variables a evaluar.....                                                       | 29     |
| 3.12. MATERIALES DE LABORATORIO .....                                                  | 30     |
| 3.12.1. Material de Laboratorio .....                                                  | 30     |
| 3.12.2. Reactivos de Laboratorio .....                                                 | 30     |
| <br>CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                           | <br>31 |
| 4.1. Los caracteres morfológicos, bioquímicos y análisis moleculares .....             | 32     |
| 4.1.1. Caracterización morfológica de las cepas bacterianas aisladas. ....             | 32     |
| 4.1.2. Características bioquímicas de las bacterias con capacidad biodegradadoras. ... | 33     |
| 4.1.3. Caracterización molecular de las cepas bacterianas .....                        | 36     |
| 4.1.3.1. Extracción de ADN .....                                                       | 36     |
| 4.1.3.2. Perfiles moleculares ERIC PCR.....                                            | 36     |
| 4.1.3.3. Dendograma. ....                                                              | 37     |
| 4.2. La capacidad biodegradadoras de las bacterias .....                               | 39     |
| 4.2.1. Capacidad de crecimiento .....                                                  | 39     |
| 4.2.2. Cinética de crecimiento a los 30 días en degradación biológica.....             | 40     |

|                                                |                                                                      |    |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.                                           | Banco de germoplasma de bacterias con capacidad biodegradadora ..... | 42 |
| 4.3.1.                                         | Banco de Germoplasma .....                                           | 42 |
| 4.4.                                           | DISCUSION .....                                                      | 43 |
| CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... |                                                                      | 45 |
| 5.1.                                           | CONCLUSIONES .....                                                   | 46 |
| 5.2.                                           | RECOMENDACIONES .....                                                | 47 |
| 5.3.                                           | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                      | 48 |
| CAPITULO VI ANEXOS .....                       |                                                                      | 54 |
| 7.1.                                           | ANEXOS .....                                                         | 55 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1: Esquema del Análisis de Varianza .....                | 27 |
| Tabla 2: Esquema del Análisis de Varianza .....                | 27 |
| Tabla 3: pruebas bioquímicas de clasificación bacteriana ..... | 33 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Ubicación de los lugares donde se recolecto las muestras de suelo ..... | 3  |
| Figura 2: Caracteres morfológicos.....                                            | 32 |
| Figura 3: Características Bioquímicas .....                                       | 35 |
| Figura 4 Perfil electroforético de ADN.. .....                                    | 36 |
| Figura 5: Perfil molecular ERIC – PCR.. .....                                     | 36 |
| Figura 6 Dendograma por el método de máxima verosimilitud .....                   | 37 |
| Figura 7. Análisis filogenético evolutivos de taxones .....                       | 38 |
| Figura 8: Capacidad de crecimiento para medios contaminados con diclorvos .....   | 39 |
| Figura 9: Capacidad de crecimiento para medios contaminados con clorpirifos ..... | 40 |
| Figura 10 Cinética de descontaminación y crecimiento celular .....                | 41 |
| Figura 11: Cinética de descontaminación.....                                      | 41 |

## INTRODUCCIÓN

Los pesticidas, son sustancias destinadas a combatir plagas o enfermedades. Surgieron por la necesidad de manejar poblaciones de organismos nocivos para la sanidad humana, cultivos o frutos almacenados y en animales domésticos. En realidad, el término plaga tiene una connotación antropocéntrica, considerada objetivamente, las plagas son simplemente poblaciones integrantes de un ecosistema (Bedmar, 2011).

A partir de la Revolución Industrial, se observó un crecimiento de las zonas urbanas con una dependencia de las rurales para la obtención de alimentos, requiriendo de una mayor producción, almacenamiento y protección de los mismos. En consecuencia, hubo un incremento sustancial de producción de sustancias químicas como parte del sostenimiento del desarrollo industrial y agrícola, donde la rama química lanzó al mercado sustancias de toxicidad inespecífica pero de bajo costo (Asela, 2014).

A nivel mundial la producción de plaguicidas orgánicos sintéticos aumento desde los inicios del siglo XX, debido al desarrollo de la industria petrolera. No obstante, la producción y uso de estos compuestos, así como de lubricantes, solventes, gasolinas u otros, han aumentado la carga de estas sustancias en la atmósfera, hidrósfera, suelos y sedimentos, lo que ha provocado episodios críticos de contaminación en el ambiente (Galán *et al.*, 2003).

Los plaguicidas, metales pesados y otras impurezas, son considerados por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, 1992) como contaminantes de acuíferos debido a su alta toxicidad, persistencia y movilidad, además de que afectan a importantes cargas hidráulicas, como lagunas y canales de irrigación; y por sus propiedades fisicoquímicas, son resistentes a la degradación biológica (Hirata, 2002).

En virtud de lo anterior, el estudio se conformará de los siguientes capítulos:

**Sección I-Marco contextual de la investigación**, integrado por: ubicación y contextualización de la problemática, problema general y derivados, delimitación del problema, objetivos y justificación.

**Sección II-Marco teórico de la investigación**, describe: fundamentos conceptuales y teóricos relativos al estudio, y los sustentos legales.

**Sección III-Metodología de la investigación**, dentro de este apartado se especifica: tipo y métodos de investigación, población y muestra, fuentes de recopilación de información, instrumento de investigación, procesamiento y análisis de la información.

**Sección IV-Resultados**, en esta sección se describen los resultados obtenidos en la investigación mediante la aplicación de técnicas de investigación avanzada siguiendo los lineamientos establecidos por la unidad de posgrado.

**Sección V- Conclusiones**, las conclusiones dan parte al cumplimiento de los objetivos fidedignos planteados, dentro este contorno se integra la parte esencial de los resultados que permiten dar un aporte significativo a la investigación.



# **CAPÍTULO I**

## **MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA**

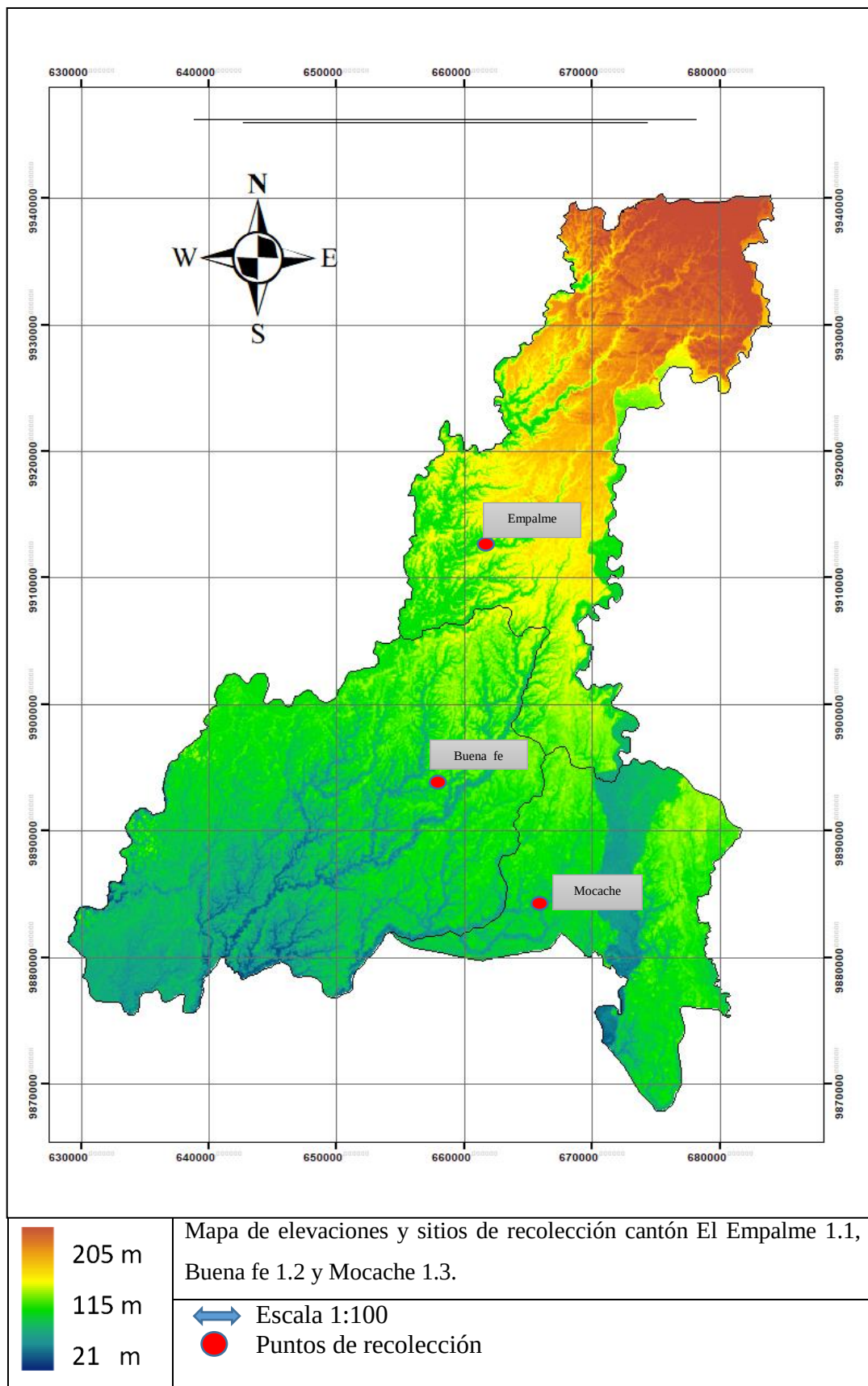
El Proyecto de Investigación se desarrolló en el Cantón Quevedo de la Provincia de Los Ríos- Ecuador. Su cabecera cantonal es la Ciudad de Quevedo. Su población es de 150.827 habitantes y tiene una superficie de 303 km<sup>2</sup>. Su actual alcalde es John Salcedo Cantos, su actividad económica principal es el comercio, la ganadería y la agricultura, se divide en 9 parroquias urbanas: 7 de octubre, 24 de mayo, Guayacán, Nicolás Infante Díaz, San Camilo, San Cristóbal, Quevedo (cabecera cantonal), Venus del Río Quevedo y Viva Alfaro y 2 rurales: La Esperanza y San Carlos (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2010).

Las bacterias son organismos unicelulares que no pueden ser divisados por el ojo humano a simple vista. Están presentes en los ciclos naturales de elementos como nitrógeno, carbono, fósforo y pueden transformar sustancias orgánicas en inorgánicas y viceversa. Es decir, la vida en nuestro planeta no existiría sin bacterias, las cuales permiten el funcionamiento de muchos ecosistemas (Marcano, 2008).

Su acción fuera de nuestro organismo es igual de importante, pues colaboran con la biodegradación de los residuos, son vitales para fertilizar la tierra e incluso para combatir ciertas plagas (Dulanto Tello, 2013).

La biorremediación involucra el uso de microorganismos para degradar contaminantes orgánicos presentes en el ambiente, transformándolos en compuestos más simples y de menor peligrosidad, inclusive inocuos. Esta estrategia de descontaminación tiene bajos costos, una amplia aceptación pública y puede llevarse a cabo en el sitio. Comparado con otros métodos, la biorremediación es una forma más promisorio y menos costosa de eliminar los contaminantes presentes en suelos y agua (Corredor *et al.* 2013).

La toma de muestras se desarrolló en Provincia de Los Ríos, en los Cantones Buena Fe y Mocache y en la Provincia del Guayas El Empalme.



Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 1:** Ubicación de los lugares donde se recolecto las muestras de suelo

## 1.2. LAS BACTERIAS CON CAPACIDAD BIOREMEDIADORAS

En los últimos años se han empleado microorganismos como bacterias y hongos para inducir degradación de compuestos tóxicos, orgánicos e inorgánicos, presentes en agua y sedimentos, con el fin de convertirlos en sustancias más sencillas y menos dañinas al ambiente. Se han aislado microorganismos aeróbicos que degradan plaguicidas organoclorados como el aldrín. Otros microorganismos anaeróbicos que necesitan mayor tiempo para realizar el proceso de degradación. Entre los microorganismos degradadores se destacan: *Bacillus sp.*, *Pseudomona sp.* y consorcios microbianos (Betancur Corredor, 2013).

La biodegradación es actualmente considerada como la alternativa menos costosa para transformar física y químicamente contaminantes presentes tanto en agua como en suelo debido a que gran variedad de bacterias cuentan con la maquinaria enzimática para transformar compuestos xenobióticos (Sepúlveda, 2005).

El potencial de los microorganismos para la biodegradación se puede obtener de una manera rápida para sólo ver si existen bacterias en un estado activo, o de una manera más a fondo, además determinar las condiciones óptimas de biorremediación y aproximar el tiempo requerido para sanear el sitio (Randy, Adams, Veronica , Dominguez, & Garcia Hernandez, 1999).

Quevedo se encuentra situado en el corazón del Litoral, por su posición geográfica y vial privilegiada ha beneficiado al país, además permite un intenso tráfico terrestre y fluvial. Posee un clima que beneficia para el cultivo. Es una población situada en las orillas del río Quevedo en el sector denominado "Las lomas". Se encuentra ubicada al 1° 20' 30" de Latitud Sur y los 79° 28' 30" de Longitud occidental, dentro de una zona subtropical (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2010).

El programa de control de guías prácticas para el Manejo Ambiental de pesticida, estos pesticidas afectan severamente a las características físicas, químicas y biológicas del suelo y agua, trasladar así en un deterioro continuo del recurso y consecuentemente en la disminución de su capacidad productiva y afectando a la salud humana.

El Proyecto de Investigación se desarrolló en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en el departamento de la Unidad de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnológica de la UTEQ-Laboratorio de Biotecnología en las áreas de Cultivo de tejido Vegetales, Microbiología y Biología Molecular, que está situado en la ciudad de Quevedo Provincia de Los Ríos Ecuador, cuenta con una población de 150.827 habitantes, su actividad económica principal es el comercio, la ganadería y la agricultura. Es la cabecera cantonal del cantón Quevedo y la ciudad más grande y poblada de la provincia de Los Ríos (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2010).

### **1.3. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA**

Ecuador es un importante productor agrícola, que ha introducido el uso, cada vez mayor de sustancias químicas nocivas, como plaguicidas, fertilizantes, etc. Esto puede traducirse en un aumento del daño citogenético, que se relaciona también con el incremento en el número de niños con malformaciones y una mayor incidencia de cáncer.

La migración sistemática desde el modelo de agricultura familiar al de agricultura de exportación industrial; tanto adultos como niños cooperan en la agricultura familiar, exponiendo a niños y adolescentes a una mayor cantidad de problemas de salud ocasionados por pesticidas; la diversidad de efectos nocivos causados por la exposición a pesticidas en el trabajo rural y la variedad de determinantes socio-culturales de la exposición de estos trabajadores; y las limitaciones de los sistemas de información y estadísticas disponibles.

La inocuidad de los alimentos de origen animal puede verse afectada por residuos de origen químico, que constituye un peligro para la salud pública. Las sustancias químicas están ligadas inevitablemente a las explotaciones ganaderas debido al empleo de medicamentos para tratar infecciones, infestaciones parasitarias y en procesos de limpieza y desinfección de utensilio. Los residuos químicos en los alimentos de origen pecuario son indeseables puesto que pueden ser nocivos para el consumidor.

En la actualidad, la presión de los consumidores para obtener alimentos libres de residuos que atentan contra la salud del ser humano está presente en todo el mundo con cambios

en los modelos de producción agropecuarios que tienden al desarrollo de sistemas de producción más sostenibles. Si bien en Ecuador los conocimientos sobre residualidad química en alimentos son escasos, se están haciendo esfuerzos para superar esta carencia en los sectores gubernamental, académico y de investigación, a fin de llevar al país a una situación favorable respecto de la inocuidad alimentaria que le permita enfrentar adecuadamente los desafíos que plantea el comercio internacional de alimentos.

## **1.4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **1.3.1. Problema general**

¿Cuál es el efecto de los microorganismos del suelo en la descomposición de las sustancias tóxicas de los pesticidas?

### **1.3.2. Problemas derivados**

- ¿Qué tipo de bacterias son las encargadas de la degradación?
- ¿Cómo se emplean las técnicas moleculares de clasificación?
- ¿Cómo se medirá la degradación bacteriana de los compuestos contaminantes?

## **1.4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA**

- **Campo:** Ciencias ambientales
- **Área:** Biotecnología suelo
- **Línea de investigación:** Evaluación de la calidad del agua, aire y suelo, incluyendo las alternativas de mitigación a los impactos ambientales.
- **Aspecto:** Biodegradación de pesticidas contaminantes del suelo
- **Tiempo:** 8 meses.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. General**

Caracterizar de forma morfológica y molecular las bacterias con potencial de biorremediación provenientes de suelos agrícolas contaminados con pesticidas de origen organofosforados.

### **1.5.2. Específicos**

- Analizar los caracteres morfológicos, bioquímicos y análisis moleculares de bacterias con capacidad biodegradadoras.
- Determinar la capacidad biodegradadoras de las bacterias plaguicidas de composición organofosforados.
- Implementar un banco de germoplasma de bacterias con capacidad biodegradadora a pesticida.

## **1.6. JUSTIFICACIÓN**

La continua necesidad de producir más alimentos es el origen del aumento de la demanda de estos productos. Los datos disponibles ponen de relieve que en los últimos años se ha producido un incremento de pesticidas del 4 a 5% anual e incluso superior en los países desarrollados.

Desde hace muchos años los hombres han utilizado distintos tipos de sustancias llamadas insecticidas de la primera generación tales como cenizas, azufre, compuestos arsenicales, tabaco molido, cianuro de hidrógeno, compuestos de mercurio, zinc y plomo, etc. para luchar contra los insectos. Éstos son productos en general muy tóxicos, poco efectivos en la lucha contra la plaga y muy persistentes en el ambiente (hasta 50 años), hoy día se usan muy poco e incluso bastantes de ellos están prohibidos por su excesiva toxicidad.

Uno de los principales problemas asociados al uso de pesticidas es el que éstos no sólo maten a la plaga, sino también a otros insectos beneficiosos como abejas y otros organismos. De esta forma pueden hacer desaparecer a los enemigos naturales de la plaga o provocar que estos se trasladen a otros lugares porque ya no encuentran alimento en ese campo y, después de un breve periodo, la población de la plaga rebrota y además en mayor cantidad que antes al no tener enemigos naturales

Algunos pesticidas tienen estructuras químicas muy estables y tardan años en degradarse en formas menos tóxicas. En las zonas en las que su empleo es continuo su concentración aumenta con el tiempo. En muchos casos estos productos son, además, difíciles de eliminar por los organismos vivos por ser poco solubles en agua y tender a acumularse en los tejidos grasos. Cuando los organismos vivos que se han contaminado con los pesticidas son ingeridos por otros, el producto contaminante se va acumulando en mayores proporciones en los tramos finales de la cadena trófica.



## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL**

### **1.1.1. Caracterización morfológica**

La caracterización morfológica de recursos microbiológicos es la determinación de un conjunto de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que permiten diferenciar taxonómicamente a las bacterias, entre esto los caracteres pueden ser altamente heredables, fácilmente observables y expresables en la misma forma en cualquier ambiente. Las características morfológicas se utilizan para estudiar la variabilidad genética, para identificar bacterias y para conservar los recursos genéticos (Hernández, 2013).

### **1.1.2. Caracterización Molecular**

La caracterización molecular significa que se está caracterizando a nivel molecular sin ningún efecto del medio ambiente, desarrollo o estado fisiológico del organismo. Es por eso que los marcadores basados en ADN se denominan marcadores moleculares (Rotchell y Ostrander, 2003).

### **1.1.3. Biorremediación**

La biodegradación es la característica de algunas sustancias químicas de poder ser utilizadas como sustrato por microorganismos, que las emplean para producir energía (por respiración celular) y crear otras sustancias como aminoácidos, nuevos tejidos y nuevos organismos, etc. No obstante en vertidos que presenten materia biodegradable estos tratamientos pueden no ser efectivos si nos encontramos con otras sustancias como metales pesados, o si el medio tiene un pH extremo (Atkins & Jones, 2006).

#### **1.1.4. Pesticida**

La concentración de plaguicidas probados estuvo en correlación con la manifestación y frecuencia de sus efectos. En general, las concentraciones más altas influyeron en la aparición, forma, naturaleza y frecuencia de los efectos citológicos, mitóticos y cromosómicos. Se encontró un efecto similar en la duración del tratamiento con estos pesticidas (Sofradzija *et al.*, 1989)

#### **1.1.5. Organofosforado**

Los organofosforados se han utilizado ampliamente como insecticidas y agentes de guerra química. Los riesgos para la salud asociados con estos agentes han hecho necesaria la necesidad de mejores herramientas de desintoxicación y biorremediación. Son de especial interés las enzimas bacterianas capaces de hidrolizar los agentes nerviosos organofosforados letales (Shih *et al.*, 1998).

#### **1.1.6. Medio de cultivo**

El cultivo de microorganismos es una actividad que requiere del conocimiento de técnicas de siembra o inoculación y de aislamiento para transferirlos de un medio a otro, o mantener su crecimiento y actividad. Es indispensable para realizar diversos estudios morfológicos, de identificación, bioquímicos, de patogenicidad y ecológicos. (Aquiahuatl, 2012).

#### **1.1.7. Microorganismos**

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre. Los microorganismos son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta (Montaño, 2010).

### **1.1.8. Identificación microbiana**

Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo. Estas técnicas se utilizan en diferentes áreas (Vizcarrondo, 2008).

- En el área clínica donde es de capital importancia conocer cuál es el agente causal de la infección que presenta un paciente, de manera de poder tratarlo con agentes terapéuticos.
- En la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos donde las normas de control de calidad exigen la ausencia de ciertos microorganismos.
- En investigación básica donde se aísla un determinado microorganismo que debe identificarse para comprobar si se trata de un microorganismo conocido o de uno nuevo para poder clasificarlo.

### **1.1.9. Bacteria**

Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las bacterias son células procariotas, por lo que, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y esta se compone de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles (Woese, 1990).

### **1.1.10. Hongos**

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas (Santanfe, 2009).

Los hongos son organismos eucariotas típicos y poseen un núcleo que contiene varios cromosomas (siete en *Candida albicans*, ocho en *Aspergillus nidulans* y dieciséis en *Saccharomyces cerevisiae*) delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80 S. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular (Arístegui, 2002).

#### **1.1.11. Biodep**

Hace algunos años se ha investigado la disminución en el impacto ambiental de estos derrames de plaguicidas al utilizar los sistemas llamados “camas biológicas”. Se ha documentado la degradación de distintos plaguicidas en estos sistemas incluyendo diversos herbicidas, insecticidas y fungicidas. Algunos estudios han logrado monitorear el comportamiento de estos sistemas durante varios años (Torstensson, 1997).

#### **1.1.12. Plaguicidas**

Los plaguicidas son compuestos químicos que sirven para combatir los parásitos de los cultivos, del ganado, de los animales domésticos y del hombre y su ambiente. De acuerdo con su actividad biológica pueden clasificarse en insecticidas, fungicidas, herbicidas y rodenticidas según que su toxicidad sea para insectos, hongos, malas hierbas o roedores. También existen los atrayentes, repelentes y esterilizantes de insectos que coadyuvan a su destrucción por medio de estas acciones (Rodríguez P. , 2014). Según su naturaleza química, en principio, pueden clasificarse en inorgánicos y orgánicos. Los primeros no plantean, en general, una problemática importante desde el punto de vista de su toxicidad y evolución en el suelo. Por el contrario en lo que se refiere a los orgánicos, se ha ido desarrollando una amplia gama de productos que plantea problemas de evolución en el complejo sistema del suelo (Sanchez, 2005).

#### **1.1.13. Suelo**

Es una capa delgada que se ha formado muy lentamente, a través de los siglos, con la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, los cambios de

temperatura y el viento. Las plantas y animales que crecen y mueren dentro y sobre el suelo son descompuestos por los microorganismos, transformados en materia orgánica y mezclados con el suelo (Labrador, 2016).

## **1.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **2.2.1. Degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas.**

El 1, 1,1-tricloro-2,2'bis (*p*-clorofenil) etano (DDT) ha sido usado desde la segunda guerra mundial para controlar enfermedades transmitidas por insectos en humanos y animales domésticos. El uso de estos insecticidas organoclorados se ha prohibido en la mayoría de los países, debido a su persistencia en el ambiente, susceptibilidad de biomagnificación y potencial toxicidad a animales superiores. La biorremediación involucra el uso de microorganismos para degradar contaminantes orgánicos presentes en el ambiente, transformándolos en compuestos más simples y de menor peligrosidad, inclusive inocuos. Esta estrategia de descontaminación tiene bajos costos, una amplia aceptación pública y puede llevarse a cabo en el sitio.

Comparado con otros métodos, la biorremediación es una forma más promisorio y menos costosa de eliminar los contaminantes presentes en suelos y agua. En suelo los compuestos bifenilos clorados como el DDT, pueden ser parcialmente biodegradados por un grupo de bacterias aerobias que cometabolizan el contaminante. La biodisponibilidad de los contaminantes puede ser mejorada, tratando los suelos en presencia de agentes movilizadores del contaminante como los surfactantes. En esta revisión se discuten las diferentes estrategias de biorremediación de suelo contaminado con DDT, incluyendo mecanismos y rutas de degradación. Se describe la aplicación de estas técnicas en suelo contaminado y se discute cuál es la mejor estrategia para remediación de DDT (Betancur et al, 2013).

### **2.2.2. Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos.**

La creciente utilización de plaguicidas organofosforados en las prácticas en los últimos años ha generado de los problemas ambientales; estos compuestos tienden a

bioacumularse a través de cadenas alimenticias que muestran altos niveles de toxicidad riesgo potencial para la salud de las especies expuestas a estas sustancias. En esta investigación se utilizaron el soxhlet y sólido micro-extracción en el espacio de cabeza (hs-spme) para la extracción de plaguicidas organofosforados en ganado agrícola suelos y leche bovina, respectivamente. La presencia de demeton smethylsulfon se determinó a concentraciones entre 272,9 y 1793.3 ppm en tierras de cultivo y 12.9 ppm en leche de vaca. Nativo se aislaron bacterias del suelo mostrando una capacidad degradante de estos pesticidas, *Bacillus* sp y *Pantoea agglomerans*, que dieron resultados de degradación de 73,5% y 68,6%, respectivamente, en la concentración de clorpirifos, demostrando que estos microorganismos son una posible solución para mejorar los suelos contaminados por este clase de pesticidas (Marín & Jaramillo, 2015).

### **1.3. FUNDAMENTACIÓN LEGAL**

#### **2.3.1. Constitución Política del Ecuador (2008)**

El Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales en la sección quinta: Suelo señala.

**Art. 409.-** Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión.

**Art. 410.-** El Estado brindará a los agricultores y a las comunidades rurales apoyo para la conservación y restauración de los suelos, así como para el desarrollo de prácticas agrícolas que los protejan y promuevan la soberanía alimentaria.

#### **2.3.2. Ley de Gestión Ambiental (2004)**

El Título I: Ámbito y Principios de la Gestión Ambiental determina que:

**Art. 1.-** La presente Ley establece los principios y directrices de política ambiental; determina las obligaciones, responsabilidades, niveles de participación de los sectores

público y privado en la gestión ambiental y señala los límites permisibles, controles y sanciones en esta materia.

**Art. 2.-** La gestión ambiental se sujeta a los principios de solidaridad, corresponsabilidad, cooperación, coordinación, reciclaje y reutilización de desechos, utilización de tecnologías alternativas ambientalmente sustentables y respecto a las culturas y prácticas tradicionales.

**Art. 3.-** El proceso de Gestión Ambiental, se orientará según los principios universales del Desarrollo Sustentable, contenidos en la Declaración de Río de Janeiro de 1992, sobre Medio Ambiente y Desarrollo.

**Art. 4.-** Los reglamentos, instructivos, regulaciones y ordenanzas que, dentro del ámbito de su competencia, expidan las instituciones del Estado en materia ambiental, deberán observar las siguientes etapas, según corresponda: desarrollo de estudios técnicos sectoriales, económicos, de relaciones comunitarias, de capacidad institucional y consultas a organismos competentes e información a los sectores ciudadanos.

**Art. 5.-** Se establece el Sistema Descentralizado de Gestión Ambiental como un mecanismo de coordinación transectorial, interacción y cooperación entre los distintos ámbitos, sistemas y subsistemas de manejo ambiental y de gestión de recursos naturales.

En el sistema participará la sociedad civil de conformidad con esta Ley.

**Art. 6.-** El aprovechamiento racional de los recursos naturales no renovables en función de los intereses nacionales dentro del patrimonio de áreas naturales protegidas del Estado y en ecosistemas frágiles, tendrán lugar por excepción previo un estudio de factibilidad económico y de evaluación de impactos ambientales.

## Título II: Del Régimen Institucional de la Gestión Ambiental

### Capítulo I: Del Desarrollo Sustentable

**Art. 7.-** La gestión ambiental se enmarca en las políticas generales de desarrollo sustentable para la conservación del patrimonio natural y el aprovechamiento sustentable



de los recursos naturales que establezca el Presidente de la República al aprobar el Plan Ambiental Ecuatoriano. Las políticas y el Plan mencionados formarán parte de los objetivos nacionales permanentes y las metas de desarrollo. El Plan Ambiental Ecuatoriano contendrá las estrategias, planes, programas y proyectos para la gestión ambiental nacional y será preparado por el Ministerio del ramo.

Para la preparación de las políticas y el plan a los que se refiere el inciso anterior, el Presidente de la República contará, como órgano asesor, con un Consejo Nacional de Desarrollo Sustentable, que se constituirá conforme las normas del Reglamento de esta Ley y en el que deberán participar, obligatoriamente, representantes de la sociedad civil y de los sectores productivos.

### **2.3.3. Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (2015)**

Parágrafo II: Del Suelo incluido en el Acuerdo Ministerial No.061 establece.

**Art. 212** Calidad de Suelos. - Para realizar una adecuada caracterización de este componente en los estudios ambientales, así como un adecuado control, se deberán realizar muestreos y monitoreos siguiendo las metodologías establecidas en el Anexo II y demás normativa correspondiente.

La Autoridad Ambiental Competente y las entidades del Sistema Nacional Descentralizado de Gestión Ambiental, en el marco de sus competencias, realizarán el control de la calidad del suelo de conformidad con las normas técnicas expedidas para el efecto. Constituyen normas de calidad del suelo, características físico-químicas y biológicas que establecen la composición del suelo.

**Art. 213** Tratamiento de Suelos Contaminados. - Se lo ejecuta por medio de procedimientos validados por la Autoridad Ambiental Competente y acorde a la norma técnica de suelos, de desechos peligrosos y demás normativa aplicable. Los sitios de disposición temporal de suelos contaminados deberán tener medidas preventivas eficientes para evitar la dispersión de los contaminantes al ambiente.

**Art. 214** Restricción. - Se restringe toda actividad que afecte la estabilidad del suelo y pueda provocar su erosión.

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **3.1. LOCALIZACIÓN**

El Proyecto de Investigación se realizó en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en el departamento de la Unidad de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnológica de la UTEQ-Laboratorio de Biotecnología en las áreas de Cultivo de tejido Vegetales, Microbiología y Biología Molecular, localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas son 01° 01” de latitud Sur y 79° 47” de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

### **3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.2.1. Experimental**

El estudio posee las cualidades de una investigación de tipo experimental científica, puesto que se realizará la manipulación directa de las variables en estudio: tipo de microorganismos y suelo contaminado con pesticidas. A través del análisis en laboratorio se procederá a la identificación de los microorganismos y clasificación de los mismos, empleando todos los estándares nacionales e internacionales que rigen la microbiología del suelo y del medio ambiente.

### **3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.3.1. Inductivo**

Será utilizado durante el proceso de aislamiento, identificación y selección de los microorganismos presentes en las camas biológicas con capacidad degradadora de pesticidas.

#### **3.3.2. Deductivo**

Permitirá evaluar el nivel de degradación y fragmentación a través del empleo de los microorganismos aislados en condiciones de laboratorio.

Las muestras recolectadas serán examinadas departamento de la Unidad de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnológica de la UTEQ-Laboratorio de Biotecnología en las áreas de Cultivo de tejido Vegetales, Microbiología y Biología Molecular

### **3.3.3. Observación científica**

Se usó durante todo el proceso de la investigación, realizando un diagnóstico de los procesos para conocer la realidad mediante la percepción directa de los objetos y fenómenos.

## **3.4. MUESTRA**

Se realizó la recolección de muestras en diferentes zonas donde estaba presentado el objeto de estudio. Se tomó 1 sub-muestras consistentes en suelo en la Finca Experimental la María ubicada en Mocache, Cantón Buena Fe de la Provincia de Los Ríos y El Empalme Provincia del Guayas del Ecuador, luego se procedió tomar 100 gramos fueron empaquetado en fundas ziploc y trasladadas en condiciones óptimas al laboratorio para no afectar los parámetros que puedan interferir en los procesos de aislamiento y selección de microorganismos de interés.

## **3.5. FUENTES DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN**

### **3.5.1. Fuentes primarias**

En las fuentes primarias se hizo uso de libros, revistas científicas y de entretenimiento, periódicos, diarios, documentos oficiales de instituciones públicas, informes técnicos y de investigación de instituciones públicas o privadas, patentes, normas técnicas para que optimizar los recursos de la investigación y tratar en lo posible reducir los riesgos dentro del área de trabajo, durante el monitoreo de la calidad del suelo, así como el procedimiento a verificar en el laboratorio.

### **3.5.2. Fuentes secundarias**

En las fuentes o informaciones secundarias se empleo enciclopedias, antologías, directorios, libros o artículos que interpretan otros trabajos que validen todos los procesos

de la investigación, como el aislamiento de los microorganismos y la fase de crecimiento en medios de cultivo selectivos.

### **3.6. INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.6.1. Ficha de laboratorio**

Se verificó toda la información relativa al análisis microbiológico en el laboratorio: número de cepas aisladas, porcentaje de pesticidas descompuestos, crecimiento microbiano, tipo de microorganismo, cinética de crecimiento, alteraciones en los medios de cultivo entre otros aspectos básicos de la investigación.

#### **3.6.2. Ficha de monitoreo**

Sirvió para el registro de la información relativa al monitoreo de los procesos de la investigación donde se evaluó: las siguientes pruebas químicas (ureasa, catalasa, tinción gram, prueba de degradación de fosforo y potasio), Morfológicas y Moleculares.

#### **3.6.3. Material virtual**

Se hizo uso de plataformas virtuales para el procesamiento de los datos y obtención de resultados.

### **3.7. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN**

Para la selección de cepas microbianas, se evaluó el crecimiento de todas las cepas en un medio mineral estéril cuya única fuente de carbón será el pesticida. Se evaluó a una concentración de los diferentes pesticidas a 300ppm. La composición del medio es: 20g/L de agar-agar, 0.007 g/L de NaCl, 0.004g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.002 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.028g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.028 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Se realizó siembra en placa por aislamiento para bacterias, por triplicado. Se incubó a una temperatura de 30°C con pH de 6.7 y se evaluó el crecimiento de forma cualitativa durante 8 días.

#### **3.7.1. Identificación de los microorganismos aislados**

La identificación de los microorganismos aislados se procedió la utilización de las técnicas básicas de microbiología, dentro de estas técnicas se empleo tinción de gram, así

como también el uso de DNeasy® Plant Mini Kit y la tinción con azul de tripan en el caso de hongos. Por medio de las características morfológicas que se realizó la respectiva clasificación.

Mediante el empleo de medios selectivos se procedió una identificación más específica y la separación de hongos y bacterias que fueron usadas en los tratamientos respectivos.

Una vez obtenida y separadas las cepas de microorganismos se procedió a su respectiva siembra en medio mineral líquida donde se adiciono el pesticida respectivo cada 8 días en concentraciones de 200ppm.

Todos los materiales de laboratorio previo a la utilización fueron esterilizados, empleando una autoclave a 125 grados centígrados durante 40 minutos.

### **3.7.2. Caracterización morfológica**

Los aislados obtenidos de cada tratamiento se sometieron a pruebas de caracterización morfológica haciendo uso de la técnica de la microgota, donde cada cepa que fue sembrada de forma individual en medio de cultivo líquido, transcurridas 24 horas se realizó diluciones seriadas en relación 1-100, para obtener un volumen final de 200 microlitros por dilución.

Cada dilución se sembró en placas que contenían 10 ml de medio de cultivo sólido, se dejó incubar por 24 horas hasta observar la formación de colonias separadas las cuales se tomaron como referencia la textura, color, elevación y forma.

El dato obtenido de la caracterización morfológica se llevó a una tabla manejada con códigos binarios donde los valores correspondientes a 1 ara referencia a la presencia de dicha variable y los valores 0 denotara la ausencia de la misma.

### **3.8. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA**

#### **3.8.1. Prueba de ureasa**

En una caja Petri con el medio agar urea se realizó la siembra mediante la técnica del agotamiento de asa, incubado a 28°C durante 24-48 y 72 horas y cambio de tonalidad ámbar claro inicial a un rosa intenso (fucsia). Los resultados positivos se muestran en las siguientes figuras. Algunas bacterias producen una elevada cantidad de enzima en el medio de cultivo lo cual modificando su coloración a fucsia.

#### **3.8.2. Prueba de fosforo**

Al ensayo de fosforo se empleó el medio de cultivo Pikoskaya compuesto: glucosa 10 g/L, nitrato de potasio 5g/L, cloruro de potasio 0,2 g/L, sulfato de amonio 0,5 g/L, sulfato de magnesio 0,1 g/L, sulfato de manganeso trazas 0,1 g/L, purpura de bromocresol 0,125 g/L, agar 15 g/L, pH  $7,0 \pm 2$ . Se evaluó a las 48 horas después de la incubación el cambio de coloración del medio como indicativo de reacción positiva.

#### **3.8.3. Prueba de potasio**

Se empleó el medio de cultivo NPRI compuesto por: Glucosa 10g/L, carbonato de calcio 3g/L, fosfato de potasio 2g/L, sulfato de magnesio 0,5g/L, cloruro de sodio 1g/L, Cloruro de potasio 0,2g/L, sulfato de amonio 0,1g/L, agar 25 g/L, pH 6,8 g/L, purpura de brocrisol 0,003 g/L. Cada cepa bacteriana se incubo en tubos de ensayo de 10 ml por 48 horas en oscuridad a 28°C. Para verificar el cambio de coloración lo que es indicativo de una degradación del compuesto.

#### **3.8.4. Prueba de catalasa**

Los microorganismos se inocularon en placas que contenían agar nutritivo incubadas a 28°C durante 24 horas, transcurrido el periodo de incubación se tomó una pequeña porción de la biomasa bacteriana en un porta objeto donde se adicionaron 3 microlitros de peróxido de hidrógeno para generar la reacción enzimática que desencadena la emisión de pequeñas burbujas en caso de ser positiva.

### **3.8.5. Prueba de proteasa**

Se realizó en agar gelatina en concentraciones y composición de: Cloruro de sodio 10 gramos por litro, peptona 5 gramos por litro, gelatina 5 gramos por litro y agar 15 gramos por litro, se realizó en autoclave por 30 minutos para texturizar y eliminar posibles contaminantes.

Las muestras bacterianas previamente crecidas fueron inoculadas en el agar Gelatina, se incubó por 48 horas a 25°C, y se observó la presencia de un halo inhibitorio que demostró la presencia de enzimática.

### **3.8.6. Prueba de tinción Gram**

La tinción bacteriana se realizó con 24 horas de incubación en medio de cultivo sólido, se extendieron las 9 muestras de forma individual en porta objetos, y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente para fijar las muestras con un mechero de alcohol, se agregó cristal violeta transcurrido un minuto las muestras se lavaron con agua eliminando los excesos del colorante. Se agregó lugol por un minuto luego se decolorar las muestras con cetona y se lavaron con agua para dar paso la colorante safranina que se dejó actuar por 1 minuto.

Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico verificando los contrastes obtenidos en cada bacteria.

### **3.8.7. Clasificación microbiana en diferentes concentraciones de contaminantes**

Todas las muestras procedentes de la cama biológica se evaluaron para constatar su desarrollo en medios de cultivo contaminados con, organofosforados (*CLORPIRIFOS*), en concentraciones de 0.01, 1.00, y 5% respectivamente el desarrollo, en la más alta concentración de contaminante dará paso a la selección del microorganismo como posible degradador de pesticidas.

Los medios de cultivo para la separación de los microorganismos, se les adiciono fungicida para impedir el desarrollo de hongos y antibiótico de amplio espectro, que



impedirá el crecimiento de bacterias, de esta forma se logró identificar en primera instancia a que grupo pertenecían.

#### **3.8.8. Velocidad de crecimiento en medios contaminados**

Los microorganismos seleccionados en las pruebas de adaptación fueron sometidos de forma individual a medios de cultivo contaminados con los pesticidas, organofosforados (*CLORPIRIFOS*) en una concentración de un 10% respectivamente, se evaluó el desarrollo cada 24 horas en relación al diámetro generado por la colonia.

Transcurridas las 72 horas de crecimiento se finalizó la toma de datos para su respectivo procesamiento, permitiendo así determinar la velocidad de crecimiento de cada microorganismo evaluado.

### **3.9. DEGRADACIÓN DE PESTICIDAS.**

Se realizó un medio de cultivo mineral en concentración y composición de: Cloruro de sodio 20g/l, Cloruro de potasio 0,7g/l, Fosfato de Potasio 2g/l, Sulfato de Magnesio 1g/l, Fosfato di sódico 3 g/l, Nitrato de Amonio 1g/l, Agua 1000 ml. Al medio mineral se le agrego como única fuente de carbono los pesticidas organofosforados (*CLORPIRIFOS*), en una concentración del 5% a cada tratamiento respectivamente.

Los datos de degradación se los evaluó por espectrofotometría, centrifugando la masa bacteriana a 8,000 revoluciones durante 1 minuto para evitar que se alteren los valores por la biomasa suspendida en el medio de cultivo. Cada tratamiento se evaluó cada 72 horas para verificar la descomposición por parte de las bacterias en la disminución de la absorbancia en relación al control que no contenía bacterias, generando valores diarios correspondientes a 1, 3, 6, 9, 12 y 15 días respectivamente.

#### **3.9.1. Caracterización molecular**

Para corroborar los datos de caracterización morfológica se empleó técnicas moleculares denominadas REP-PCR que consistirá en la extracción de ADN bacteriano haciendo uso del KIT DNA Extractor, obteniendo un volumen de 20 microlitros de ADN genómico.

Las muestras de ADN se sometieron a PRC empleando los partidores universales ERIC-PCR. Las reacciones PCR con secuencias repetidas altamente conservadas se realizaron con los iniciadores:

ERIC1R (3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5').

ERIC2 (5'-AAGTA AGTGACTGGGGTGAGCG-3').

La reacción se llevó a un volumen final de 25 µL, que contenían 50 ng de ADN, 1 U de Taq ADN polimerasa, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,0 mM de dNTPs y 0,1 µM de cada iniciador. El proceso de amplificación de los iniciadores ERIC consistirá de 1 ciclo inicial de desnaturalización 95°C por 6 min, 35 ciclos de desnaturalización con la siguiente secuencia: 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 65°C por 8 min, y un 1 ciclo final de extensión de 65°C por 16 min.

### **3.9.2. Generación de árbol filogenético (Dendograma)**

Para la generación del árbol filogenético A cada banda con diferente movilidad electroforética se le asignó un número y una puntuación de 1 o 0 en función de la presencia o ausencia de la banda y mediante el software Mega6 se realizó un Árbol Filogenético empleando el método de Kimura aplicando la máxima verosimilitud.

### **3.9.3. Conservación en banco de germoplasma**

Las muestras se las proceso en medios de cultivos específicos para su conservación en ultra congelador los medios estarán compuestos por 10 gramos de agar ultra puro 15 gramos de peptona y glicerina al 10%.

Cada bacteria se dejó incubar en medio de cultivo King B por 48 horas a 28 grados centígrados. Posteriormente se realizó la separación de cada colonia con una punta de micro pipeta para re inocularla en los tubos viales con 800ul de medio de cultivo de conservación.

### 3.10. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.10.1. Diseño para evaluar los caracteres morfológicos, bioquímicos y análisis moleculares de bacterias con capacidad biodegradadoras

Se empleó un diseño completamente al azar DCA, para la degradación de urea la y velocidad de crecimiento del consorcio microbiano fueron analizados bajo 10 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones y 3 unidades experimentales.

**Tabla 1:** Esquema del Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---------------------|--------------------|
| <b>Error</b>        | 29                 |
| <b>Tratamientos</b> | 9                  |
| <b>Total</b>        | 38                 |

#### 3.10.2. Diseño para Determinar la capacidad biodegradadoras de las bacterias plaguicidas de composición organofosforados.

Se empleó un diseño completamente al azar DCA, para determinar la degradación de los compuestos contaminantes del consorcio microbiano donde se analizó bajo 10 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones y 2 unidades experimentales.

**Tabla 2:** Esquema del Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---------------------|--------------------|
| <b>Error</b>        | 29                 |
| <b>Tratamientos</b> | 9                  |
| <b>Total</b>        | 38                 |

### **3.10.3. Obtener un banco de germoplasma de bacterias con capacidad biodegradadora a pesticida**

Para la realización del siguiente objetivo no se empleó ningún diseño experimental, solo se validó y se respaldaron los microorganismos obtenidos en la investigación dentro de un banco de germoplasma empleando metodologías establecidas en base al requerimiento.

## **3.11. MANEJO DEL EXPERIMENTO**

### **3.11.1. Aislamiento de bacterias**

Se preparará una suspensión del suelo rizosferico en agua destilada (1g/100ml), se someterá a calor a temperatura de 80 °C durante 10 minutos. Posteriormente se realizará una siembra por dilución en placas a la dilución  $10^{-3}$  conteniendo King B sólido, (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0 g; glicerol, 15 ml;  $K_2HPO_4$ , 1.5 g;  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 1.5 g; agar, 15 g; agua destilada (pH 7.2)]. La incubación se realizará en condiciones de aerobiosis para garantizar que las especies esporulantes anaerobias queden eliminadas. Las placas serán incubadas a temperatura ambiente por 48 horas luego de esto se procederá a la resiembra en un medio de King B sólido para posteriormente ser almacenadas a -4°C.

### **3.11.2. Identificación**

La identificación de las UFC. Se realizó mediante la técnica de coloración de Gram y la prueba de la catalasa. Se procedió a la evaluación de los caracteres morfológicos de colonia: circular, puntiforme, irregular y fusiforme; borde de la colonia: entera, ondulado, lobulado y filamentoso; y elevación de la colonia: plana, convexa y elevada. Los bacilos Gram positivos aerobios y catalasa positivos, serán clasificados como pertenecientes al género. Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras de suelo rizosferico.

### **3.11.3. Aislamiento de bacterias**

La metodología utilizada para el aislamiento de las cepas a partir de diluciones de suelo rizosferico se ajustará a la descrita por Vincent (1970). El medio de cultivo que se utilizó

para el crecimiento de la bacteria es el medio *Pseudomona* agar F (King B) y se incubó a 28°C durante 3 días. Se seleccionaron aquellas colonias con características culturales semejantes a *Pseudomonas*, a través de la evaluación de los caracteres morfológicos de colonia: circular, puntiforme, irregular y fusiforme; borde de la colonia: entera, ondulado, lobulado y filamentoso; y elevación de la colonia: plana, convexa y elevada.

Además de usar como indicativo las colonias que no absorbieran el colorante rojo congo. Adicional a esto se realizarán pases sucesivos de ellas en LMA hasta obtener un cultivo puro. Posteriormente se conservaron las muestras usando la técnica de agar profundo a 4°C. La pureza de los cultivos, así como sus características tintoriales y la morfología de las células, se determinarán mediante la tinción de Gram (Sosa, Elías, García y Sarmiento, 2004). El estudio de las características culturales de las cepas (forma y tamaño de las colonias, color y textura) y de la tasa de crecimiento, se realizará mediante la siembra de cada uno de los aislados en medio *Pseudomona* agar F (King B) a pH 6,8 y se incubarán 3 días a 28°C. Después se observará mediante un microscopio estereoscópico.

#### **3.11.4. Variables a evaluar**

- Crecimiento en medios contaminados

Se evaluó a las 72 horas después de la inoculación en un espectrofotómetro a 600 nm, cada cepa bacteriana fue crecida por separado en matraces.

- Reducción de contaminantes

Se avaluó 30 días por densidad óptica hasta determinar el punto de reducción de cada contaminante en medio de cultivo King B, cada 48 horas se tomaron datos en cubetas de cuarzo.

- Morfología

Se evaluó la morfología en base a la tabla de caracteres microbiológicos bacterianos dejando crecer cada cepa por dilución en medio de cultivo King B solido por 24 horas a 28°C.

### **3.12. MATERIALES DE LABORATORIO**

#### **3.12.1. Material de Laboratorio**

- Tubos ephendorf 1,5 ml (1 paquetes)
- Guantes quirúrgicos
- Juego de micro-pipetas (1000 µl, 200 µl, 20 µl y 2 µl)
- Puntas amarillas (200 µl) (2 paquetes), Puntas azules (1000 µl) (1 paquetes)
- Placas Petri desechables (100 unidades)
- Autoclave
- Incubadora
- Microondas
- Refrigeradora
- Balanza

#### **3.12.2. Reactivos de Laboratorio**

- Peptona
- Fosfato de potasio  $K_2HPO_4$
- Sulfato de magnesio  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- King B
- Agar
- Buffer 10x
- Blue Juice
- Dream Taq Pol
- Bromuro de Etidio
- DNTPs
- Glicerol
- Buffer MES
- Alcohol 99 % (40 L)
- Agua ultra pura libre de Rnasa (1000 ml)
- Agarosa (50g)
- Peptona (1000 g)

## **CAPÍTULO IV**

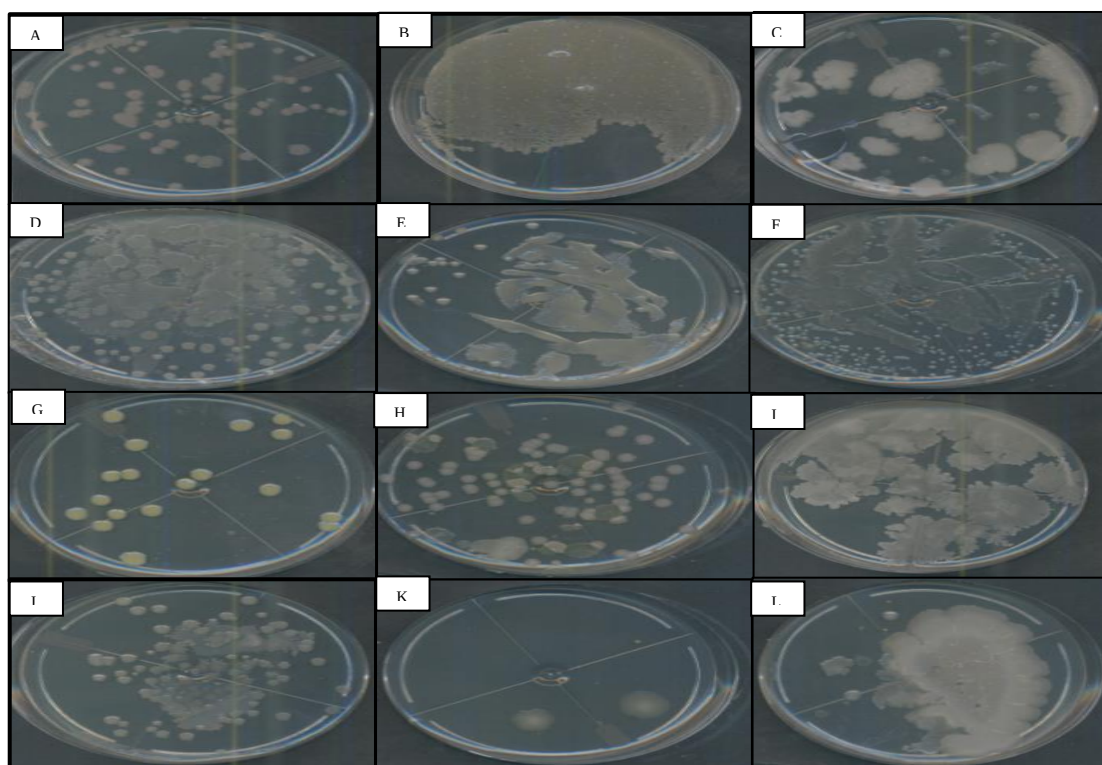
### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Los caracteres morfológicos, bioquímicos y análisis moleculares de bacterias con capacidad biodegradadoras.

##### 4.1.1. Caracterización morfológica de las cepas bacterianas aisladas.

El crecimiento de las colonias correspondientes a cada tratamiento se destacan las cepas de coloración crema y morfología con elevación convexa margen entero y forma circular, a excepción de las cepas **EMP-TAB2** que presento forma irregular elevación menor (plana) y margen lobulado como se muestra en la figura 2.

Las diferencias morfológicas en cada cepa son determinadas por las condiciones de desarrollo de los sitios específicos de aislamiento y recolección de las muestras provenientes de las provincias de los Ríos cantón Buena Fe, Mocache. Provincia del Guayas cantón el Empalme. Las características permiten la clasificación de cada individuo, se pueden apreciar 3 grupos relacionados por sus características morfológicas (Figura 2).



Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 2:** Caracteres morfológicos coloniales a 48 horas de crecimiento en medio King B sólido. A) M-G1, B) M-G2, C) M-G3, D) EMP-TAB1, E) EMP-TAB2, F) EMP-TAB3, G) Mc-BF-M, H) BF-M1, I) EMP-TAB4, J) BF-M2, K) M-C1, L) M-C2.



#### 4.1.2. Características bioquímicas de las bacterias con capacidad biodegradadoras.

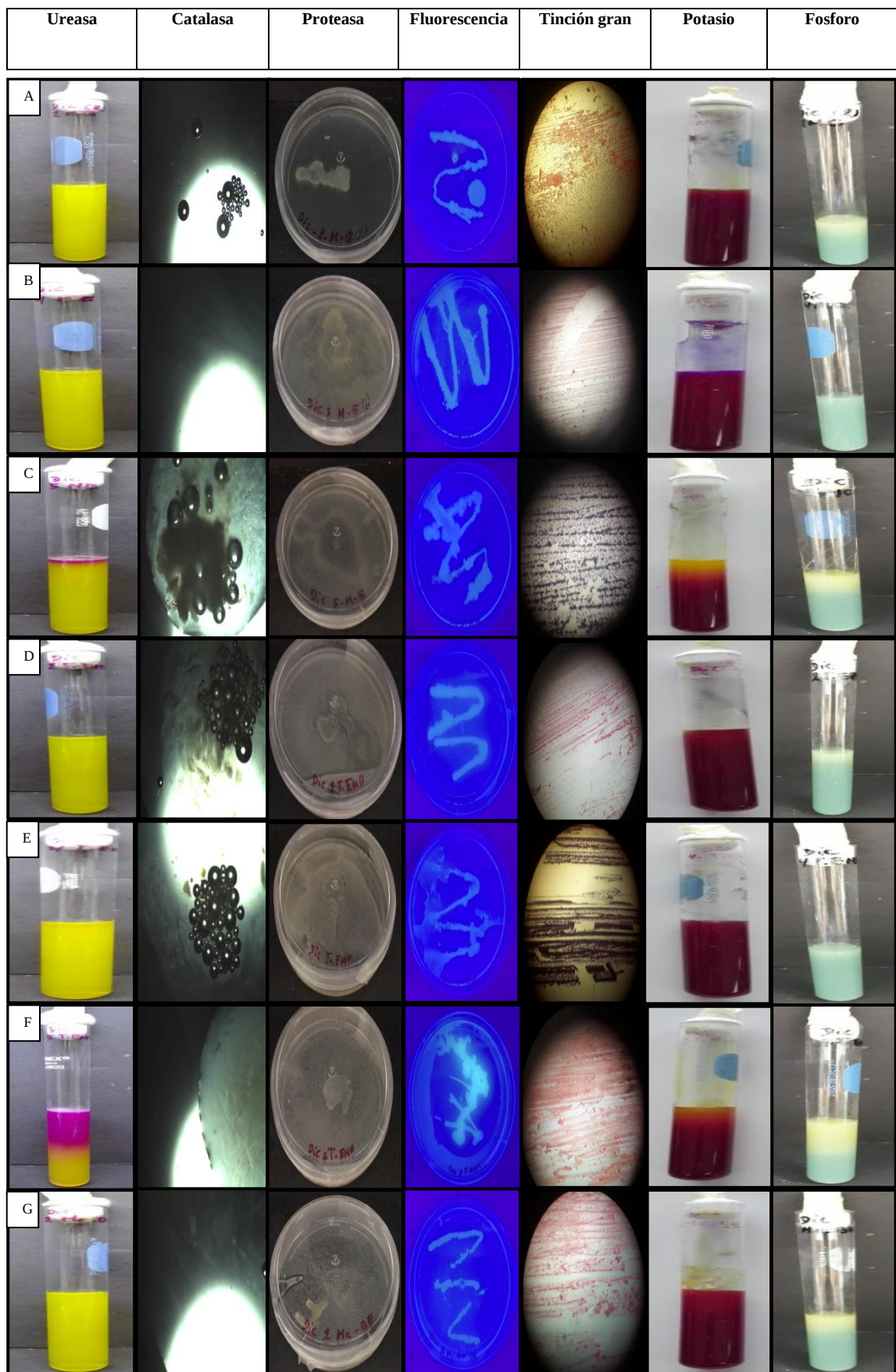
Las pruebas bioquímicas revelaron la capacidad de las cepas para desdoblar componentes como urea fosforo y potasio, las cepas con mejor capacidad fueron M-G3 BFM y MC2 que poseen una alta capacidad enzimática y metabólica mientras que las demás cepas revelaron bajo potencial en las pruebas bioquímicas realizadas, cabe destacar que las pruebas realizadas nos permitieron la clasificación y reagrupación según su capacidad.

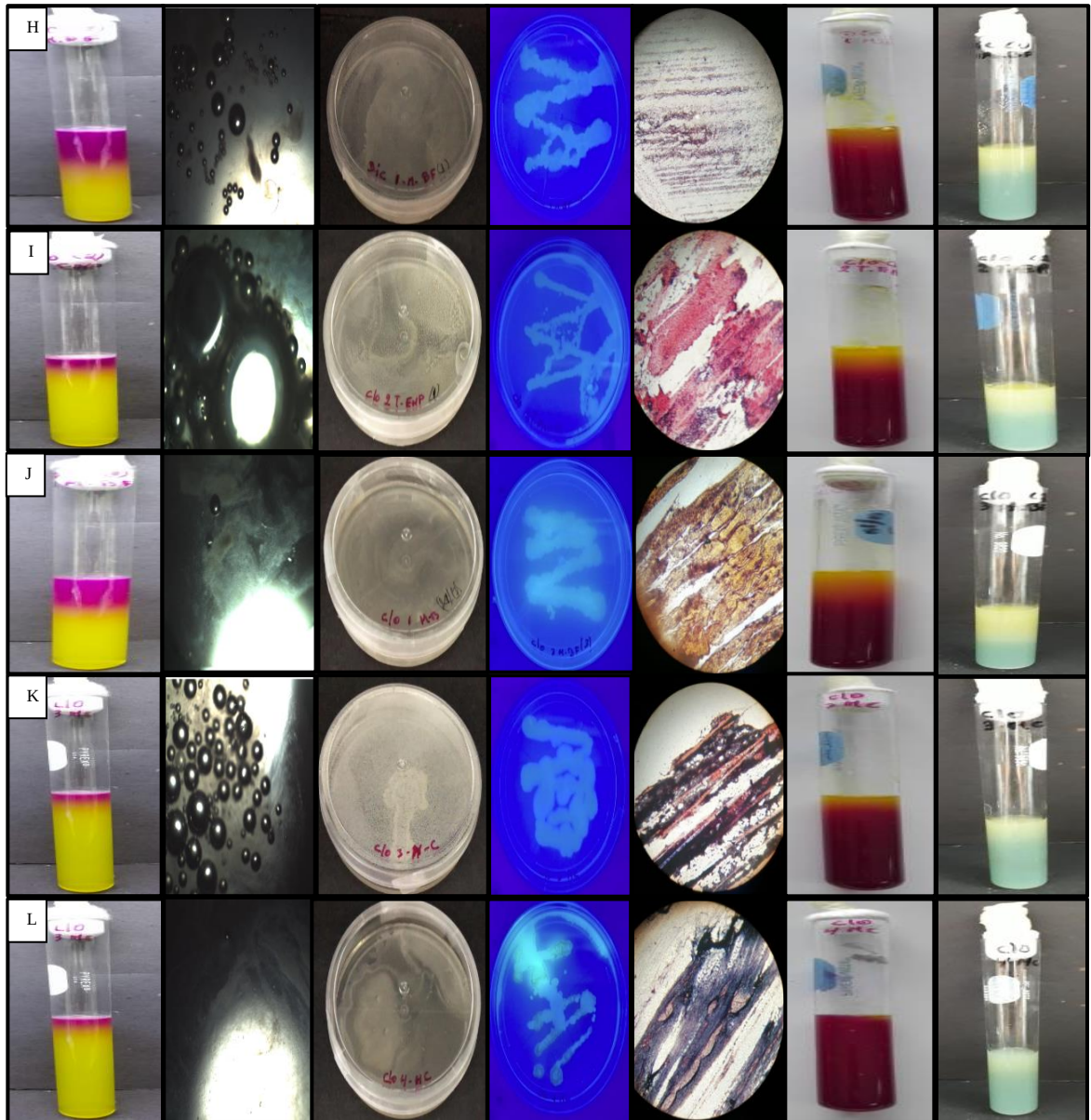
En la tinción de Gram las predominancias de bacterias Gram + y Gram negativas fue de forma simultanea existiendo la misma cantidad de ambas clasificaciones, las cepas MG2 y EMP-TAB no lograron producir fosfatasas.

| Cepas    | Ureasa | Catalasa | Proteasa | Fluorescencia | Tinción gran | Potasio | Fosforo |
|----------|--------|----------|----------|---------------|--------------|---------|---------|
| M-G1     | -      | +        | +        | -             | -            | +       | +       |
| M-G2     | -      | +        | -        | +             | -            | -       | -       |
| M-G3     | +      | +        | +        | +             | +            | +       | +       |
| EMP-TAB1 | -      | +        | -        | +             | -            | -       | +       |
| EMP-TAB2 | -      | -        | -        | -             | +            | -       | -       |
| EMP-TAB3 | ++     | -        | +        | ++            | -            | +       | ++      |
| Mc-BF-M  | -      | -        | +        | -             | -            | +       | +       |
| BF-M1    | ++     | +        | -        | +             | +            | ++      | ++      |
| EMP-TAB4 | +      | +        | -        | ++            | -            | ++      | ++      |
| BF-M2    | ++     | -        | -        | ++            | +            | ++      | ++      |
| M-C1     | +      | +        | +        | -             | +            | +       | +       |
| M-C2     | +      | -        | +        | ++            | +            | +       | +       |

Autor: Mendoza, 2020.

**Tabla 3:** pruebas bioquímicas de clasificación bacteriana





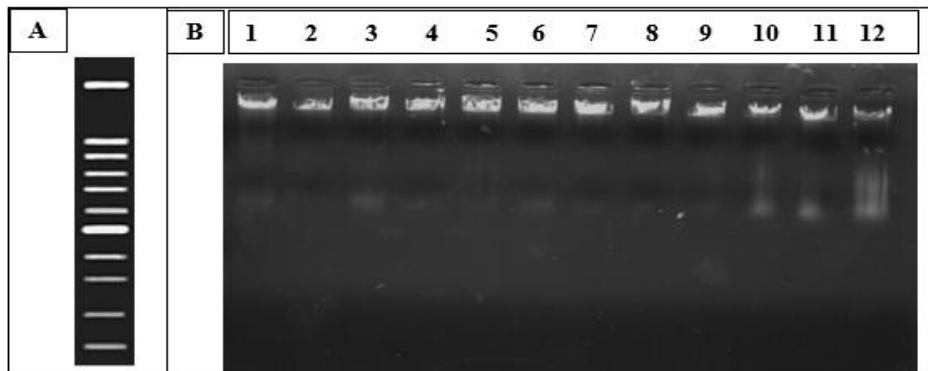
Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 3:** Características Bioquímicas de las cepas bacterianas a 48 horas de crecimiento en medio King B sólido. A) M-G1, B) M-G2, C) M-G3, D) EMP-TAB1, E) EMP-TAB2, F) EMP-TAB3, G) Mc-BF-M, H) BF-M1, I) EMP-TAB4, J) BF-M2, K) M-C1, L) M-C2.

### 4.1.3. Caracterización molecular de las cepas bacterianas

#### 4.1.3.1. Extracción de ADN

Se observa un patrón de bandeo monomórfico que nos indica similitud en las concentraciones de DNA, cada banda indica la presencia de ácidos nucleicos concentrados en el gel de agarosa.

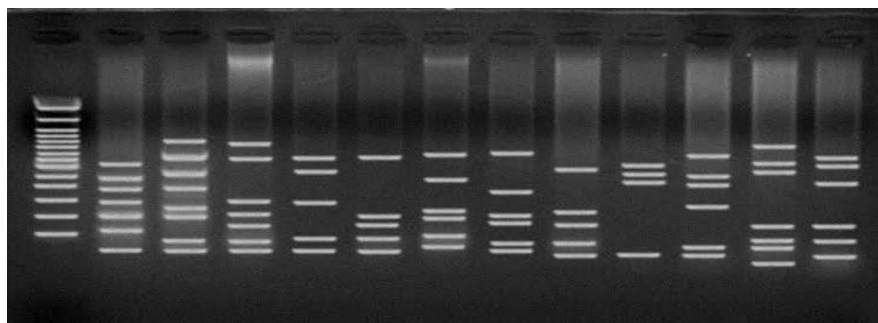


Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 4** Perfil electroforético de ADN. A. marcador molecular 100 bp y B. bandeo monomórfico, 1) M-G1, 2) M-G2, 3) M-G3, 4) EMP-TAB1, 5) EMP-TAB2, 6) EMP-TAB3, 7) Mc-BF-M, 8) BF-M1, 9) EMP-TAB4, 10) BF-M 2, 11) M-C1, 12) M-C2.

#### 4.1.3.2. Perfiles moleculares ERIC PCR

El polimorfismo molecular de cada cepa en estudio generó diferenciaciones específicas entre ellas, en relación a su adaptación y capacidad de biodegradación de compuestos organofosforados, que van desde los 100 hasta los 1300 pares de bases generando entre 4 y 8 perfiles genéticos. El carril 9 obtuvo el menor bandeo correspondiente a la cepa EMP-TAB2 quien fue la única cepa en no mostrar características bioquímicas favorables como la Ureasa, Proteasa, Catalasa y Fosfatasa.



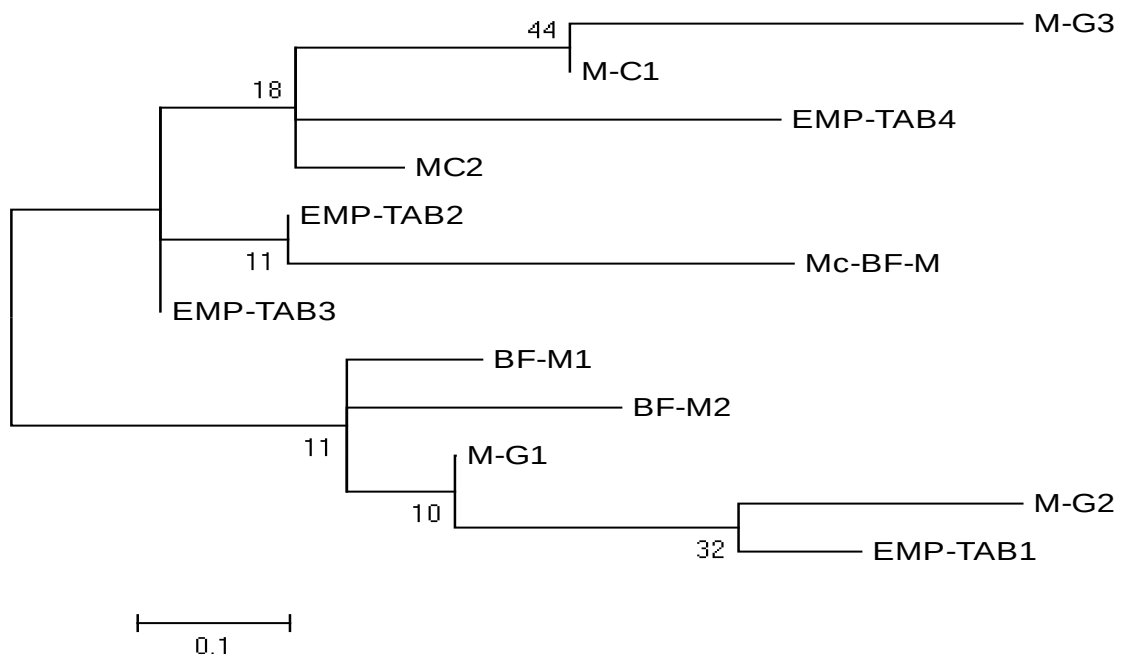
Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 5:** Perfil molecular ERIC – PCR. A. marcador molecular 100 bp y B. bandeo monomórfico, 1) M-G1, 2) M-G2, 3) M-G3, 4) EMP-TAB1, 5) EMP-TAB2, 6) EMP-TAB3, 7) Mc-BF-M, 8) BF-M1, 9) EMP-TAB4, 10) BF-M 2, 11) M-C1, 12) M-C2.

#### 4.1.3.3. Dendograma.

##### 4.1.3.3.1. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud

La historia evolutiva se infiere utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de tiempo reversible general. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-79.3999). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron aplicando el método de unión de vecinos a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 12 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1° + 2° + 3° + Sin codificación. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 14 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6

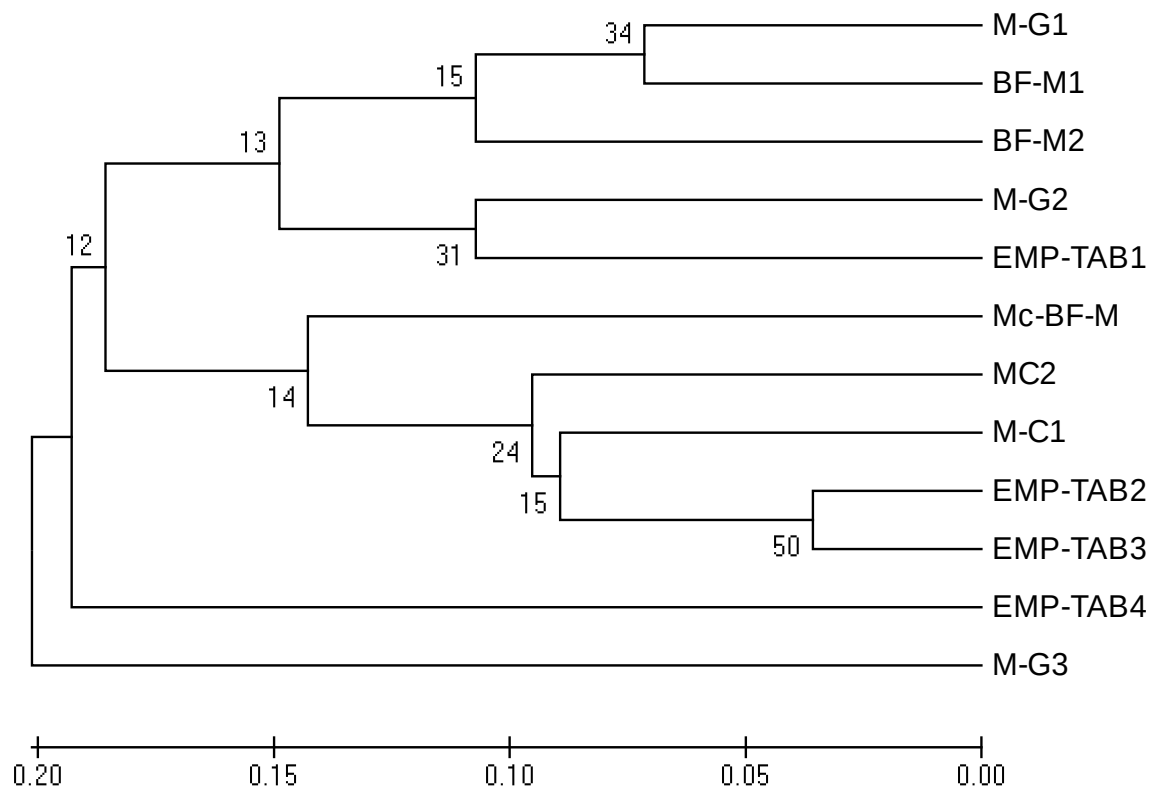


Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 6** Dendograma por el método de máxima verosimilitud

#### 4.1.3.3.2. Relaciones evolutivas de taxones.

La historia evolutiva se infiere utilizando el método UPGMA. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 1.57878788. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (2000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de la distancia p y están en las unidades del número de diferencias de base por sitio. El análisis incluyó 12 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1° + 2° + 3° + Sin codificación. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 14 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6.



Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 7.** Análisis filogenético evolutivos de taxones

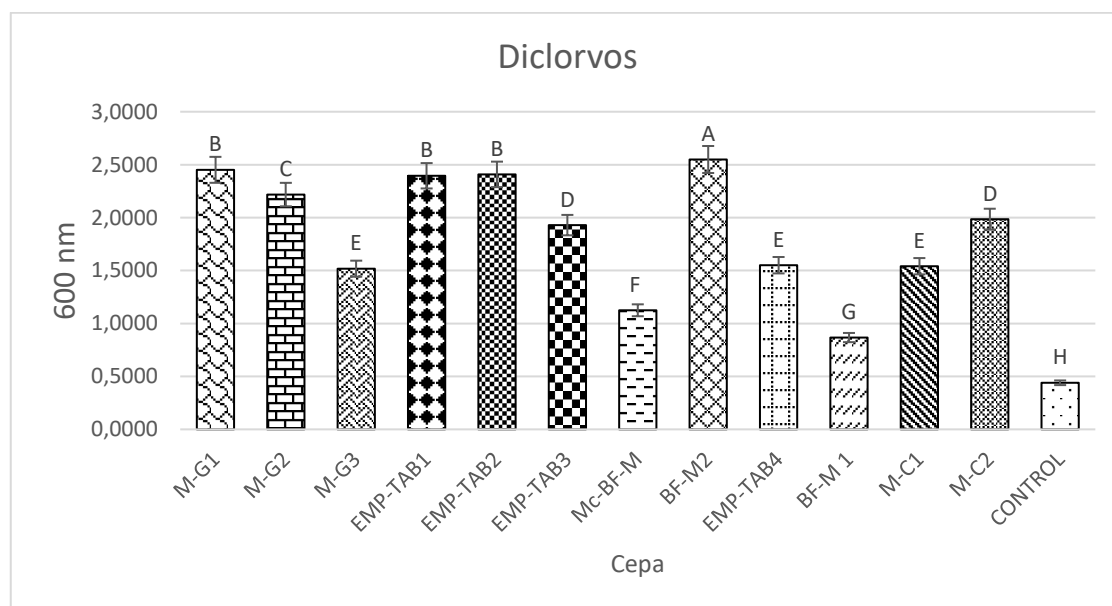


## 4.2. La capacidad biodegradadoras de las bacterias plaguicidas de composición organofosforados.

### 4.2.1. Capacidad de crecimiento

Luego de haber incubado las bacterias por 5 días a 28°C se realizó las pruebas de absorbancia a 600 nm para determinar el crecimiento bacteriano en condiciones de contaminación y seleccionar las mejores. Destacándose las cepas BF-M2, M-G1, EMP-TAB1- EMP-TAB2 por su crecimiento acelerado en medios de cultivo contaminados con Diclorvos con valores de 2.548, 2.451, 2.395, 2.408 nanómetros respectivamente. Las demas cepas superaron al testigo sin inoculación bacteriana como indicativo de crecimiento celular.

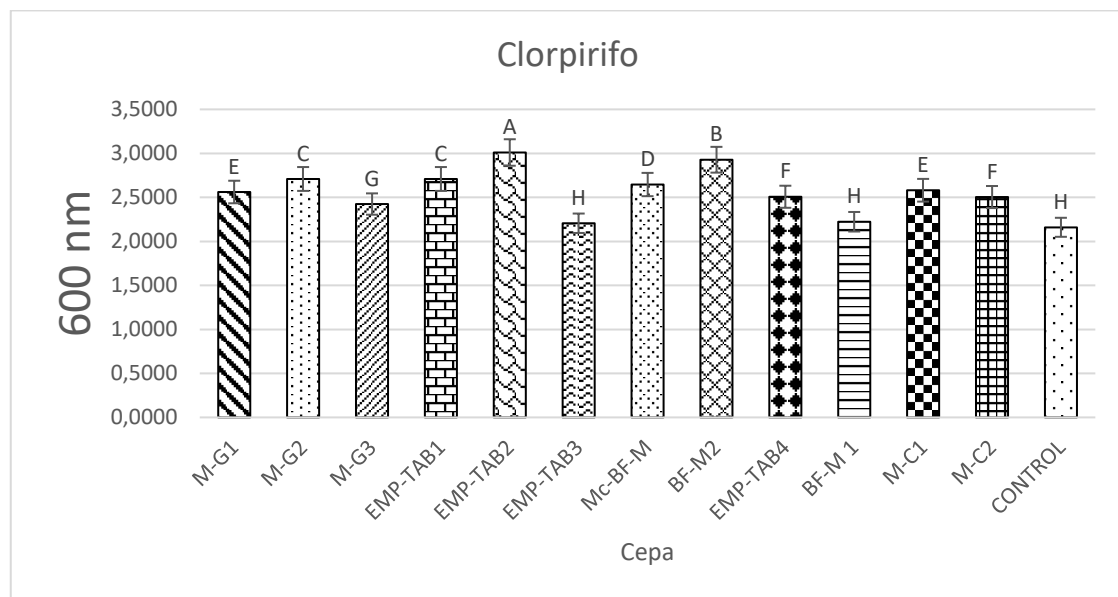
Las fuentes de energía presentes en la solución nutritiva fueron únicamente Diclorvos, comprando con el crecimiento las cepas tuvieron la capacidad de asimilar los compuestos organofosforados para emplearlo en la síntesis biológica y división celular.



Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 8:** Capacidad de crecimiento para medios contaminados con diclorvos. Las barras de error indican  $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (test de Duncan).

Tras la incubación bacteriana por 5 días a una temperatura de 28°C, para determinar el crecimiento bacteriano en medios contaminados, se realizó la prueba de absorbancia a 600 nm destacándose las mejores cepas EMP-TAB2, BF-M2, M-G2, EMP-TAB1 debido a su crecimiento en medio contaminado con clorpirifo dichos valores van de 3.01, 2.92, 2.70, 2.70 nanómetros respectivamente. Las otras cepas mostraron valores superiores al tratamiento testigo sin inoculante bacteriana señal de que existe un crecimiento celular por parte de todas las bacterias estudiadas.



Autor: Mendoza, 2020.

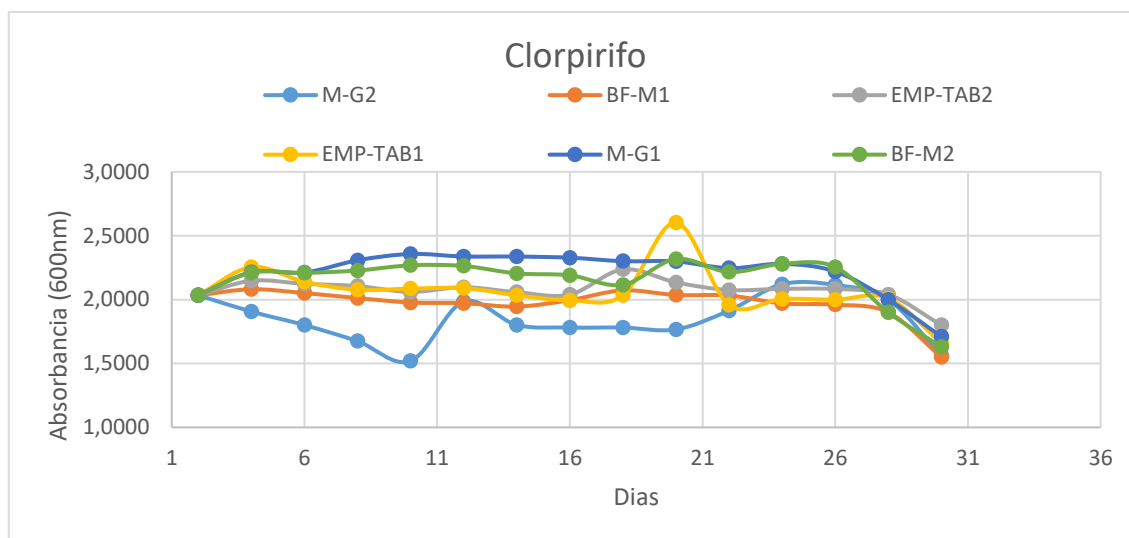
**Figura 9:** Capacidad de crecimiento para medios contaminados con clorpirifos. Las barras de error indican  $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (test de Duncan).

#### 4.2.2. Cinética de crecimiento a los 30 días en degradación biológica

Las cepas seleccionadas para el estudio de degradación se escogieron por sus parámetros físico químico y características de crecimientos en medios contaminados.

Existen variaciones extremas en el crecimiento y reducción del contaminante las cepas muestran reducción a los 30 días después de la inoculación bacteriana la cepa MG2 mostro una reducción considerable a los 10 días después de la inoculación pero retorna el contaminante al medio debido a la intoxicación producida por lo tanto su cinética de descontaminación es poco regular y estable, mientras que la cepa BFM1 tiene la mejor estabilidad y presenta reducción a los 30 días después de la inoculación.

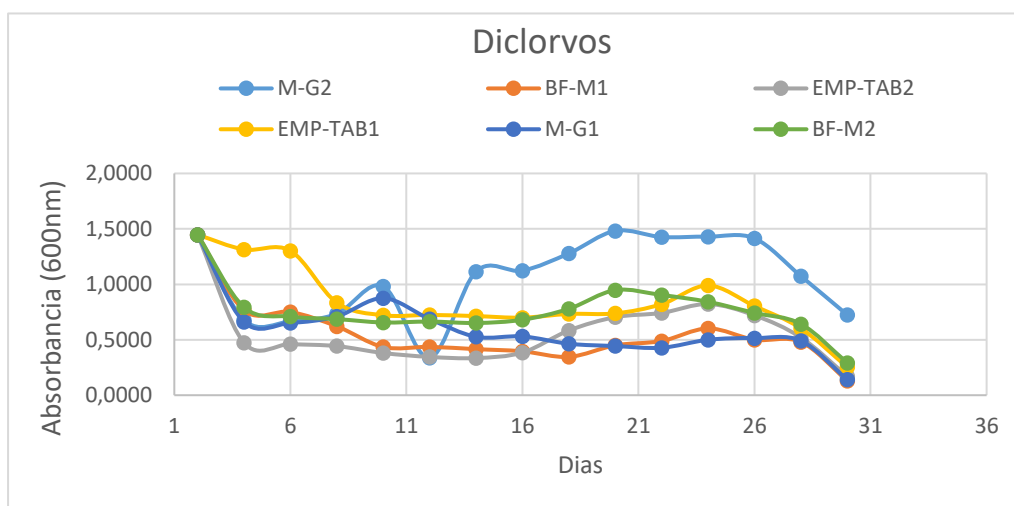




Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 10** Cinética de descontaminación y crecimiento celular en medios de cultivo contaminados durante 30 días de incubación a 28°C.

Las concentraciones de diclorvos parten con la misma concentración de contaminante y muestran reducción considerable de la turbidez del medio a los 4 días después de la inoculación a excepción de la cepa MG2 que mostro el mismo comportamiento que el ensayo anterior dando un crecimiento diausico con baja extremas y retomando a los 14 días su actividad. Todas las cepas empiezan a reducir la contaminación a los 26 días.



Autor: Mendoza, 2020.

**Figura 11:** Cinética de descontaminación y crecimiento celular en medios de cultivo contaminados durante 30 días de incubación a 28°C.

### 4.3. Banco de germoplasma de bacterias con capacidad biodegradadora a pesticida.

#### 4.3.1. Banco de Germoplasma

En el banco de germoplasma se conservaron 12 cepas de todo el experimento, seleccionadas por su capacidad de tolerar altas concentraciones de contaminantes, dichas cepas estarán disponibles para el desarrollo de nuevas investigaciones y el escalamiento científico para que puedan ser utilizadas por beneficiarios inmediatos del sector agrícola.

En la **tabla 4:** se describe su ubicación y demás características técnicas de conservación que permiten el acceso directo a la información y disponibilidad de material genético.

| Cepas    | Zona de recolección                    | Ubicación de conservación                        | Numero de muestras | Fecha de siembra | Temperatura de conservación |
|----------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------|------------------|-----------------------------|
| M-G1     | Provincia de los Ríos-Cantón Mocache.  | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 10                 | 20/02/2020       | -40 °C                      |
| M-G2     | Provincia de los Ríos-Cantón Mocache.  | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 10                 | 20/02/2020       | -40 °C                      |
| M-G3     | Provincia de los Ríos-Cantón Mocache.  | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 10                 | 20/02/2020       | -40 °C                      |
| EMP-TAB1 | Provincia del Guayas-Cantón El Empane. | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 10                 | 18/02/2020       | -40 °C                      |
| EMP-TAB2 | Provincia del Guayas-El Empane.        | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 12                 | 18/02/2020       | -40 °C                      |
| EMP-TAB3 | Provincia del Guayas-El Empane.        | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 10                 | 18/02/2020       | -40 °C                      |
| Mc-BF-M  | Provincia de los Ríos-Cantón Buena Fe. | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 12                 | 18/02/2020       | -40 °C                      |
| BF-M1    | Provincia de los Ríos-Cantón Buena Fe. | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 12                 | 18/02/2020       | -40 °C                      |
| EMP-TAB4 | Provincia del Guayas-El Empane.        | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 10                 | 14/02/2020       | -40 °C                      |
| BF-M2    | Provincia de los Ríos-Cantón Buena Fe. | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 10                 | 14/02/2020       | -40 °C                      |
| M-C1     | Provincia de los Ríos-Cantón Mocache.  | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 15                 | 11/02/2020       | -40 °C                      |
| M-C2     | Provincia de los Ríos-Cantón Mocache.  | Ultra congelador laboratorio. Biología Molecular | 15                 | 11/02/2020       | -40 °C                      |

Autor: Mendoza, 2020.

#### 4.4. DISCUSION

El crecimiento de las unidades formadoras de colonias UFC de las cepas bacterianas presentaron una elevación prominente de forma circular, las diferencias morfológicas de las cepas están influenciadas por las condiciones de desarrollo a las que son sometidas ya que mostraron un crecimiento aceptable y diferenciado, lo que nos lleva a deducir que serán capaces de sobrevivir a suelos contaminados tal como lo dice (Jaramillo Colorado et al., 2016), que las bacterias con tasas de crecimiento aceptables pueden subsistir en medios saturados.

El crecimiento de las colonias correspondientes a cada tratamiento destacándose cepas de coloración crema y morfología con elevación convexa margen entero y forma circular El 50% de las bacterias en estudio fueron Gram positivas mientras que el restante fue Gram negativa resultados que coinciden con el estudio realizado por Marín L. , (2015) las pruebas bioquímicas de identificación, sugirieron la presencia de dos tipos de bacilos, la cepa 1 fue un bacilo gram negativo (-) y la cepa 2 fue un bacilo gram positivo.

Un gran porcentaje de bacterias aisladas de suelos agrícolas contaminados lograron desarrollarse en los medios que contenían pesticidas organofosforados en concentraciones altas, debido a su capacidad de adaptación y degradación de moléculas químicas complejas, Trinder et al, (2016) varias especies de *Lactobacillus* fueron seleccionadas para la tolerancia de 100 ppm de CP o paratión en caldo MRS basado en curvas de crecimiento de 24 h. mientras en el estudio realizado por Ortiz y Sánchez, (2010) demuestran que los experimentos de curva de crecimiento mostraron que el consorcio bacteriano pudo crecer en un medio mineral que contenía TCV como la única fuente de carbono Sin embargo, solo una cepa pura fue capaz de eliminar TCV en medio mineral, mientras que todos lo eliminaron en medio rico.

En la cinética de crecimiento y descontaminación se logró alcanzar valores positivos de viabilidad hasta los 30 días después de la inoculación de las cepas bacterianas logrando un nivel de absorbancia de 1.5 a 1.8 nm cuyos valores difieren con lo descrito por Yañez et al, (2009) quien señala que la cinética de eliminación se registró para el consorcio suspendido e inmovilizado usando un medio de sal mineral suplementado con MP y TCF

a 25 mg / L y con glucosa al 0,1% (p / v) como con sustrato. La viabilidad del consorcio cultivado en suspensión se mantuvo durante 6 días, mientras que la viabilidad del consorcio inmovilizado en soportes de alginato y tezontle se mantuvo durante hasta 11 y 13 días, respectivamente (p.22).

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. CONCLUSIONES

- La variabilidad morfológica en las bacterias aisladas no muestra mayor diferencia debido a sus adaptaciones y expresiones genotípicas ligadas a las condiciones edafoclimáticas de los lugares de recolección.
- El tiempo mínimo de incubación bacteriana que permite reducir la concentración de la contaminación es de 30 días bajo condiciones de laboratorio.
- Las bacterias conservadas en el banco de germoplasma son todas las que lograron capacidad de crecimiento en medios de cultivo contaminados, la preservación permite la constancia de investigaciones futuras.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- El empleo de bacterias descontaminantes de los suelos mejora la calidad del mismo y permite mantener un equilibrio en el ecosistema.
- Los programas de biorremediación deben ser procesados en base al tipo de microorganismo y su tiempo de acción tratando en lo posible no aumentar la concentración de contaminantes para permitir una mayor eficacia del tratamiento.
- El empleo de técnicas moleculares en la diferenciación de especies es imprescindible en las investigaciones ya que mejora el entendimiento de sus actividades metabólicas y genéricas.

### 5.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, O. E. (1981). *The leguminosae: a source book of characteristics, uses, and nodulation*. Wisconsin: University of Wisconsin.
- Annan, G. ., (2012). *Choice of hydrogen uptake (Hup) status in legume-rhizobia symbioses*. Ecol.
- Aquiahuatl, M. (2012). Manual de practicas de Laboratorio Microbiología General. *DBS division de Ciencias y De La Salud*, 28-60.
- Arístegui, B. (2002). El reino de los hongos. *Rev Iberoam Micol*.
- Asela, M. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud . *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 1-10.
- Aslim. (2002). Determination of some properties of Bacillus isolated from soil. *Agroecologia*, 41-48.
- Atkins, P., & Jones, L. (2006). *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. México, D.F.: Ed. Médica Panamericana.
- Bedmar, F. (2011). Informe especial sobre plaguicidas agrícolas. *Universidad Nacional de Mar del Plata*, 27.
- Berhard-Reversat. (1986). "Soil nitrogen mineralization under a Eucalyptus plantation and natural Acacia forest in Senegal". For. Ecol. Manage.
- Betancur Corredor. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con el pesticida 1, 1, 1-tricloro-2, 2'bis (p-clorofenil) etano (ddt) mediante protocolos de bioestimulación y adición de surfactante. *Biorremediación de suelo* .
- Corona, Munive, Sánchez, Corona , M., Salinas, Chávez, & Bermúdez. (2005). *IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO EN NÓDULOS DE PLANTAS DE LUPINUS MONTANUS HBK*. Obtenido de IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO EN



NÓDULOS DE PLANTAS DE LUPINUS MONTANUS HBK:  
[https://www.researchgate.net/publication/266486088\\_IDENTIFICACION\\_DE\\_BACTERIAS\\_FIJADORAS\\_DE\\_NITROGENO\\_EN\\_NODULOS\\_DE\\_PLANTAS\\_DE\\_LUPINUS\\_MONTANUS\\_HBK](https://www.researchgate.net/publication/266486088_IDENTIFICACION_DE_BACTERIAS_FIJADORAS_DE_NITROGENO_EN_NODULOS_DE_PLANTAS_DE_LUPINUS_MONTANUS_HBK)

Dias, Franco, Campello, Faria, & Da silva. (1995). *Leguminosas forestales: aspectos relacionados con su nutrición y uso en la recuperación de suelos degradados*. Brasil.

Dulanto Tello, A. (2013). Asignación de competencias en materia de residuos sólidos de ámbito municipal y sus impactos en el ambiente.

Goldstein. (1986). *Bacterial solubilization of mineral phosphates*. Agric. Obtenido de Bacterial solubilization of mineral phosphates: about:blank#blocked

Hernandez, Cubillos, & Milian. (2012). *Aislamiento de cepas de Rhizobium spp., asociadas a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe*. Obtenido de La formación del nódulo es un proceso inducido por un intercambio de señales entre los dos participantes de la interacción:: [https://www.researchgate.net/publication/298069900\\_Aislamiento\\_de\\_cepas\\_de\\_Rhizobium\\_spp\\_asociados\\_a\\_dos\\_leguminosas\\_forrajeras\\_en\\_el\\_Centro\\_Biotecnologico\\_del\\_Caribe\\_Isolation\\_of\\_Rhizobium\\_spp\\_associated\\_two\\_forage\\_leguminous\\_in\\_the\\_Caribbean\\_Biotech](https://www.researchgate.net/publication/298069900_Aislamiento_de_cepas_de_Rhizobium_spp_asociados_a_dos_leguminosas_forrajeras_en_el_Centro_Biotecnologico_del_Caribe_Isolation_of_Rhizobium_spp_associated_two_forage_leguminous_in_the_Caribbean_Biotech)

Hernández Villarreal, A. E. (2013). Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. CONACYT.

Hirata, R. (2002). Carga contaminante y peligros a las aguas subterráneas. *Revista Latino-Americana de Hidrogeología*, 81-90.

ADDIN Mendeley Bibliography CSL\_BIBLIOGRAPHY Jaramillo Colorado, B. E., Bermúdez Tobón, A., & Tirado Ballestas, I. (2016). Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados presentes en suelos contaminados. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 25(3), 13–22. <https://doi.org/10.13140/rg.2.2.20023.73>

- Labrador, J. (7 de Noviembre de 2016). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Obtenido de Manejo del Suelo: <http://www.fao.org/soils-portal/manejo-del-suelo/es/>
- Liu, Z. H. (18 de Febrero de 2006). *Springer Link*. Obtenido de Springer Link: Xuming LiuHongxing ZhaoSanfeng Chen
- Loon, V. (2007). *Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria*. Eur. J. Plant Pathol.
- López, Campos, Valencia, Velázquez, Farías, & Macías. (2009). *Bacillus megaterium modifica la arquitectura de la raíz de Arabidopsis independientemente de auxinas y etileno*. Obtenido de Bacillus megaterium modifica la arquitectura de la raíz de Arabidopsis independientemente de auxinas y etileno.
- Lucy M, R. E. (2000). *Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria*. Antonie van Leeuwenhoek .
- Lugtenberg, K. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Microbiol*, 63: 541-556.
- MANDAL. (2005). *Plasmid-Mediated Dimethoate Degradation by Bacillus licheniformis Isolated from a FreshWater Fish Labeo rohita*. Obtenido de Plasmid-Mediated Dimethoate Degradation by Bacillus licheniformis Isolated from a FreshWater Fish Labeo rohita: [http://orgprints.org/23097/1/Badía\\_Aislamiento.pdf](http://orgprints.org/23097/1/Badía_Aislamiento.pdf)
- Marcano. (2008). El lado positivo de las bacterias. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 63-65.
- Marín, L. F., & Jaramillo, B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 179-18

- Marín, L. (2015). Isolation of organophosphate pesticides degrading bacteria found in soil and bovine milk. *Revista chilena de nutrición*, 179-185.
- Marín, L. F., & Jaramillo, B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Chil Nutr*, 179-185.
- Miranda, M. O. (9 de Octubre de 2008). *NCBI*. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922298>
- Montaño, N. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Ciencia y Cultura ELEMENTOS*, 15 - 23.
- Ortiz-Hernández, M. L., & Sánchez-Salinas, E. (2010). Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(1), 27-38.
- Pieper, D. H., & Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 11(3), 262-270.
- Randy, H., Adams, s., Veronica, I., Dominguez, R., & Garcia Hernandez, L. (1999). POTENCIAL DE LA BIORREMEDIACION DE SUELO Y AGUA IMPACTADOS POR PETROLEO EN EL TROPICO MEXICANO. *Terra latinoamericano*, 159 - 174.
- Rodríguez. (1999). *Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion*. *Biotechnol.*
- Rodríguez, P. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 372-387.
- Rotchell, J., & Ostrander, G. (2003). Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6(5), 453-496.

- Sanchez, M. (2005). LOS PLAGUICIDAS ADSORCIÓN Y EVOLUCIÓN EN EL SUELO. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 30-65.
- Santanfe. (2009). Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. *Ciencias biológicas*, 63-69.
- Sepúlveda. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *Instituto Nacional de Ecología*.
- Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S., & Lusi, A. J. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394(6690), 284-287.
- Sofradzija, A., Hadziselimovic, F., & Maslic, E. (1989). Genotoksicnost pesticida.
- Sperber. (1958). *The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil*. Agric. .
- Torstensson, L. (1997). Use of Biobers in Sweden to Minimize Environmental Spillages from Agricultural Spraying Equipment. *Pesticide Outlook*, 24-27.
- Trinder, M., McDowell, TW, Daisley, BA, Ali, SN, Leong, HS, Sumarah, MW y Reid, G. (2016). El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* reduce la absorción de pesticidas organofosforados y la toxicidad para *Drosophila melanogaster*. *Microbiología aplicada y ambiental* , 82 (20), 6204-6213.
- Tsavkelova, K. S. (2006). NCBI. Obtenido de NCBI.
- Vargas, C. (2017). *PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN ESPECIES FORESTALES PARA SU ADAPTACIÓN Y REFORESTACIÓN*. Obtenido de PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN ESPECIES FORESTALES PARA SU ADAPTACIÓN Y REFORESTACIÓN: <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/904>

- Vizcarrondo, M. (2008). *IDENTIFICACIÓN MICROBIANA. Identificación microbiana mediante métodos basados en sistema de utilización de sustratos, inmunoensayos y detección molecular*. Editorial Médica Panamericana.
- Whipps. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
- Woese, C. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 4576 - 9.
- Yañez-Ocampo, G., Sanchez-Salinas, E., Jimenez-Tobon, G. A., Penninckx, M., & Ortiz-Hernández, M. L. (2009). Removal of two organophosphate pesticides by a bacterial consortium immobilized in alginate or tezontle. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2-3), 1554-1561.

## **CAPITULO VI**

### **ANEXOS**

## 7.1. ANEXOS

**Anexo 1:** Certificado del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico

**URKUND**

**Document Information**

|                   |                                                                                |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Analyzed document | Proyecto de Investigacion Posgrado 2019 Antonio Mendoza final.docx (D76232058) |
| Submitted         | 7/10/2020 4:51:00 PM                                                           |
| Submitted by      |                                                                                |
| Submitter email   | hcanchignia@uteq.edu.ec                                                        |
| Similarity        | 5%                                                                             |
| Analysis address  | hcanchignia@uteq@analysis.urkund.com                                           |

**Sources included in the report**

**SA**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO / tesis maestria URKUND.docx**  
Document tesis maestria URKUND.docx (D40266235)  
Submitted by: hcanchignia@uteq.edu.ec  
Receiver: hcanchignia@uteq@analysis.urkund.com

**Entire Document**

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO UNIDAD DE POSGRADO MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL PORTADA

Perfil de Investigación previo a la obtención del Grado Académico de Magister en Gestión Ambiental.

TEMA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS PROVENIENTES DE SUELOS AGRÍCOLAS CON POTENCIAL EN BIORREMEDIADORA A PESTICIDAS DE ORIGEN ORGANOFOSFORADOS. AÑO 2019

AUTOR

ING. ANTONIO FRANCISCO MENDOZA LEON

Quevedo – Ecuador 2019-2020

Ing. Hayron Canchignia Martínez PhD.  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Anexo 2:** Muestras de suelo recolectadas de diversos lugares de la Provincia de Los Ríos y el Guayas



**Anexo 3:** Plaguicidas organofosforados

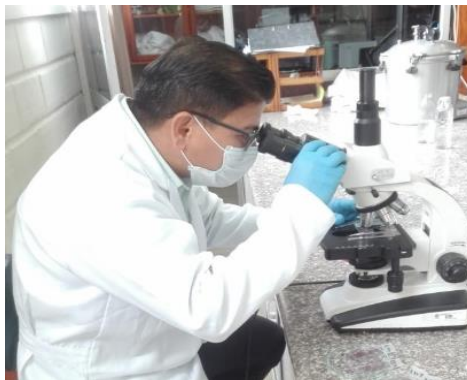
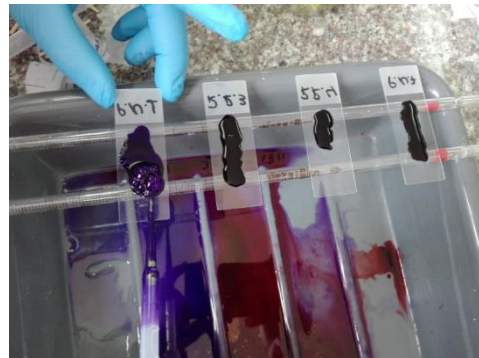
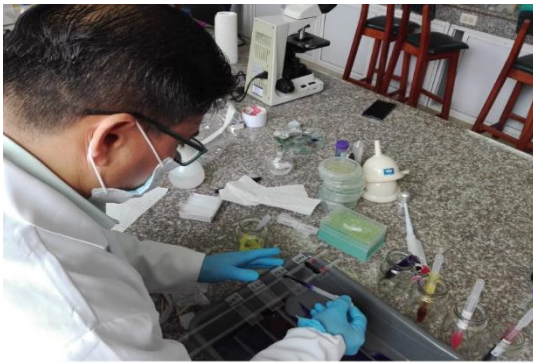


**Anexo 4:** Procesamiento de las muestras recolectadas.





**Anexo 5:** Aislamiento y purificación bacteriana a partir de las muestras de suelo



## **ANEXO 6: Caracterización molecular de las cepas bacterianas**

### **Extracción de ADN**



### **Obtención de perfiles polimórficos moleculares**



## **Anexo 7.** Protocolo de extracción de ADN

1. Disrupt samples ( $\leq 100$  mg wet weight or  $\leq 20$  mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser, or a mortar and pestle.
2. Add 400  $\mu$ l Buffer AP1 and 4  $\mu$ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation. Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
3. Add 130  $\mu$ l Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.
4. Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g. 74
6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.
7. Transfer 650  $\mu$ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g ( $\geq 8000$  rpm). Discard the flowthrough. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500  $\mu$ l Buffer AW, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g. Discard the flowthrough.
9. Add another 500  $\mu$ l Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g. Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
11. Add 100  $\mu$ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g.
12. Repeat step 11.