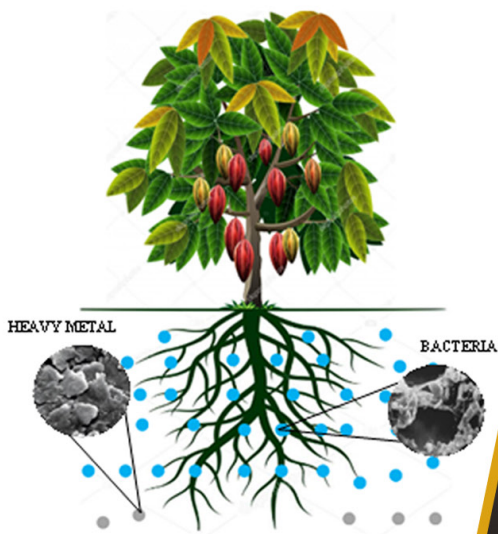


EMPLEO DE BACTERIAS COMO ALTERNATIVA DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON MERCURIO (HG), ZINC (ZN), ALUMINIO (AL) Y COBRE (CU) CON EMPLEO DE BACTERIAS.



Angel Virgilio Cedeño Moreira
Hayron Fabricio Canchignia Martínez

**EMPLEO DE BACTERIAS COMO ALTERNATIVA DE BIORREMEDIACIÓN
EN SUELOS CONTAMINADOS CON MERCURIO (Hg), ZINC (Zn),
ALUMINIO (Al) Y COBRE (Cu) CON EMPLEO DE BACTERIAS.**

Publicado por: Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
Dir. Av. Quito km 1½ vía a Santo Domingo de los Tsáchilas,
Quevedo, Ecuador. www.uteq.edu.ec.

Derechos reservados: © Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador 2022.
Dirección de Investigación Ciencia y Tecnología (DICYT).
Se autoriza la reproducción de esta publicación con fines
educativos y otros que no sean comerciales sin permiso escrito
previo detentar el derecho de autor, mencionando la cita.

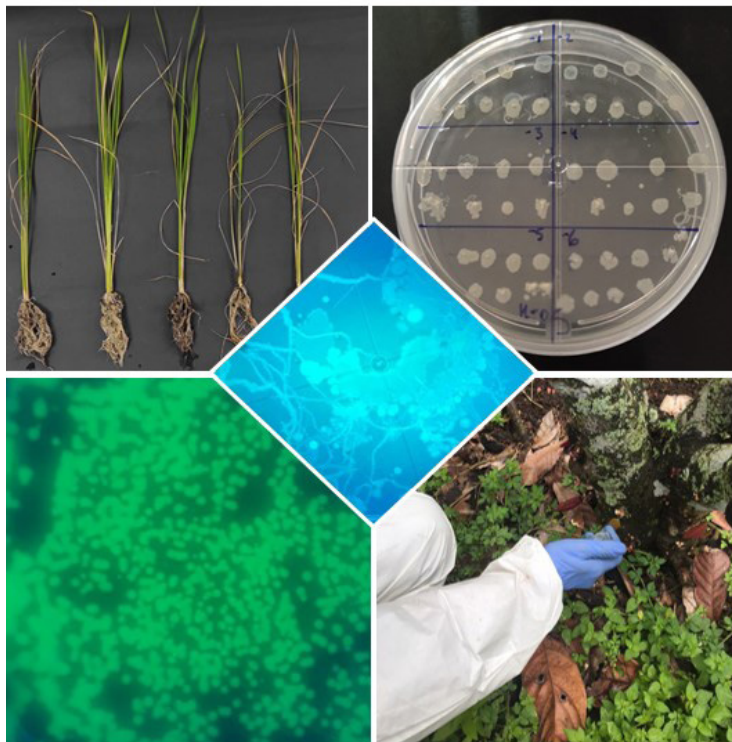
Cita del libro: Cedeno A. y Canchignia H. 2022. Empleo de Bacterias como
alternativa de Biorremediación en suelos contaminados con
Mercurio (Hg), Zinc (Zn), Aluminio (Al) y Cobre (Cu) con
empleo de bacterias. Universidad Técnica Estatal de Quevedo,
Ecuador. 80 pp.

Revisión de Pares Externos: Javier Andrés Auhing Arcos
Magister en Gestión Ambiental
Dirección Provincial de Gestión Ambiental de la Prefectura del
Guayas
Jefferson Javier Guato Molina
Magister en Agronomía con mención producción agrícola sostenible
Nestle Ecuador

Diseño y Diagramación: Ing. J. Bladimir Mora Macías
Diseñador Gráfico y Multimedia.

Primera Edición: Quevedo, Septiembre del 2022.

ISBN: 978-9978-371-41-1



► PRESENTACIÓN:

El Comité Editorial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) es la unidad encargada de promover, gestionar y administrar el conocimiento resultante de las actividades de investigación científica, la docencia y la vinculación de docentes y estudiantes. Dentro del procedimiento para el reconocimiento al profesorado y estudiantado de la UTEQ se contempla la publicación como libros de Tesis de grado y posgrado que se distingan por su innovación, metodología, rigor técnico o impacto social.

La tesis presentada en opción al grado de Magister en Gestión Ambiental del Ing. Angel Virgilio Cedeño Moreira, obtenido en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, atiende a la normativa existente para ser publicado como libro y por ello el Comité Editorial de la UTEQ aprueba la visibilidad y acceso a la comunidad académica, científica y sociedad en general.



**EMPLEO DE BACTERIAS COMO ALTERNATIVA DE BIORREMEDIACIÓN
EN SUELOS CONTAMINADOS CON MERCURIO (Hg), ZINC (Zn),
ALUMINIO (Al) Y COBRE (Cu) CON EMPLEO DE BACTERIAS.**

AUTORES:

Angel Virgilio Cedeño Moreira
Hayron Fabricio Canchignia Martínez



PRÓLOGO

En los últimos años se ha suscitado una gran preocupación. Expresado sobre problemas de contaminación del suelo con metales pesados debido a la rápida industrialización y urbanización. Estos elementos pueden bioacumularse en plantas y animales eventualmente abriéndose camino hacia humanos a través de la cadena alimentaria. Las muestras de suelo representan un excelente medio para monitorear la concentración de metales pesados debido a la contaminación antropogénica que generalmente depositan metales en la capa superficial del suelo. Además, los suelos no solo sirven como fuentes de ciertos metales, sino que pueden también funcionar como fregaderos para contaminantes metálicos. Estudios de metales pesados en el ecosistema han indicado que muchas áreas cercanas a complejos urbanos, o los principales sistemas de carreteras contienen enormes concentraciones de estos elementos.

Este trabajo investigativo destaca la importancia de la micro flora en la mitigación de los efectos por acumulación de metales pesado, mediante el aislamiento de bacterias presentes en los suelos agrícolas quienes responden de forma favorable a situaciones de estrés dando paso a la formación de moléculas complejas que reducen la concentración de metales pesados, aportando así indirectamente al desarrollo óptimo de tecnologías para contrarrestar la contaminación en las zonas de Quevedo, Buena Fe y Mocache.

Los ensayos desarrollados en este trabajo permiten dar cumplimiento a los objetivos planteados en la investigación, direccionado con bases científicas y metodológicas que conllevan al descubrimiento de nuevas tecnologías de biorremediación en el campo agrícola y ambiental.



Firmado electrónicamente por:
FERNANDO
ABASOLO
PACHECO

Ing. Fernando Abasolo Pacheco Ph.D.

RESUMEN EJECUTIVO

Los metales pesados se consideran unos de los contaminantes más tóxicos en el ambiente por tener efectos nocivos a nivel de toda la cadena trófica, debido a su persistencia y toxicidad, siendo la minería una de principales fuentes de contaminación. La presente investigación tiene como objetivo el aislamiento y caracterización de bacterias con potencial en la biorremediación de suelos contaminados con mercurio (Hg), zinc (Zn), aluminio (Al) y cobre (Cu). Para aquello se recolectaron muestras de suelo tres sitios agrícolas con antecedentes de explotación intensiva, de cultivos que exhiben alta demanda de agroquímicos correspondiente a las ciudades de Quevedo, Buena Fe y La Maná; Se pesaron 2 g de suelo previamente recolectado y se transfirió en Matraz de 50 ml, mezclado con 20 ml de agua destilada y luego se mantuvo en un agitador rotatorio con una velocidad de 150 rpm a 30 °C durante 30 min. Se prepararon placas de agar de levadura triptófano peptona glucosa (YTPG), suplementado con metales pesados en las siguientes concentraciones: HgCl_2 , 100, 150, 200, 250, 300 ppm; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mM, Cu a 25, 30, 35, 40 y 45 ppm: y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ a 100, 200, 300, y 400 ppm, que se utilizaron para aislar cepas de bacterias tolerantes. Las agrupaciones filogenéticas se clasificaron en 2 grupos primarios asociando principalmente las características morfológicas. En las distribuciones morfológicas el 58.6 % de las cepas presentaron forma granular, un 37.9% puntiforme y el 3.4% convexa, así mismo el 51.7% de las cepas bacterianas fueron Gram positivas. La cepa LM1 mostro los promedios más altos de absorbancia en condiciones de contaminación directa con zinc, También se evidencio elevada carga celular en el tratamiento de Mercurio correspondiente a las cepas QV8 y QV9 con promedios de 0.75 y 0.69 nm consiguiendo los valores más altos de los aislados de la zona de Quevedo. Las variaciones en las concentraciones de metales pesados posteriores al tratamiento biológico con bacterias tolerantes, se ven claramente afectadas por las concentraciones celulares presentes en la solución del suelo.

ABSTRACT

Heavy metals are considered one of the most toxic pollutants in the environment because they have harmful effects throughout the entire food chain, due to their persistence and toxicity, with mining being one of the main sources of contamination. The objective of this research is the isolation and characterization of bacteria with potential in the bioremediation of soils contaminated with mercury (Hg), zinc (Zn), aluminum (Al) and copper (Cu). For that, soil samples were collected from three agricultural sites with a history of intensive exploitation, of crops that exhibit high demand for agrochemicals corresponding to the cities of Quevedo, Buena Fe and La Maná; 2 g of soil previously collected were weighed and transferred into a 50 ml flask, mixed with 20 ml of distilled water and then kept on a rotary shaker with a speed of 150 rpm at 30 °C for 30 min. Yeast Tryptophan Peptone Glucose (YTPG) agar plates, supplemented with heavy metals in the following concentrations were prepared: HgCl₂, 100, 150, 200, 250, 300 ppm; ZnSO₄ 7H₂O, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM, Cu at 25, 30, 35, 40 and 45 ppm; and Al₂ (SO₄) at 100, 200, 300, and 400 ppm, which were used to isolate tolerant bacteria strains. The phylogenetic groupings were classified into 2 primary groups, mainly associating the morphological characteristics. In the morphological distributions, 58.6% of the strains presented granular, 37.9% punctate and 3.4% convex, likewise 51.7% of the bacterial strains were Gram positive. The LM1 strain showed the highest absorbance averages under conditions of direct contamination with zinc. High cell load was also evidenced in the Mercury treatment corresponding to the QV8 and QV9 strains with averages of 0.75 and 0.69 nm, achieving the highest values of the isolated from the Quevedo area. The variations in the concentrations of heavy metals after the biological treatment with tolerant bacteria are clearly affected by the cellular concentrations present in the soil solution.

PORTADA.....	1
PRÓLOGO.....	6
RESUMEN EJECUTIVO.....	7
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
INDICE DE ANEXOS.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13

CAPÍTULO I. MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA.....	16
1.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA.....	17
1.3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	17
1.3.1. Problema general.....	17
1.3.2. Problemas derivados.....	17
1.4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	18
1.5. OBJETIVOS.....	19
1.5.1. General.....	19
1.5.2. Específicos.....	19
1.6. JUSTIFICACIÓN.....	19

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL.....	22
2.1.2. Contaminación.....	22
2.1.4. Contaminación.....	22
2.1.5. Suelo contaminado.....	23
2.1.7. Grupos de metales pesados.....	25
2.1.10. Bacteria.....	25
2.1.11. Bacteria biorremediadora.....	26
2.1.13. Caracterización morfológica.....	27
2.1.14. Biosorción.....	27
2.1.15. Biotransformación.....	28
2.1.16. Caracterización filogenética.....	28

2.2.	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	29
2.2.1.	Biosorción de cobre.....	29
2.2.2.	Evaluación de la Biosorción de Cobre.....	29
2.2.3.	Eliminación de metales pesados mediante biosorción.....	30
2.2.4.	Bacterias endófitas en suelos contaminados con mercurio.....	31
2.2.5.	Biorremediación de mercurio y níquel por bacterias.....	31
2.2.6.	Contribución de las bacterias solubilizantes de zinc.....	32
2.2.8.	Bacterias asociadas fitoestabilización de zinc y plomo.....	33
2.3.	FUNDAMENTACIÓN LEGAL.....	34
2.3.1.	Constitución Política del Ecuador (2008).....	34
2.3.2.	Ley de Gestión Ambiental (2004).....	34

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.	LOCALIZACIÓN.....	39
3.2.	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	39
3.2.1.	EXPERIMENTAL.....	39
3.3.	MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....	39
3.3.1.	INDUCTIVO.....	39
3.3.2.	DEDUCTIVO.....	39
3.3.3.	OBSERVACIÓN CIENTÍFICA.....	40
3.3.4.	MUESTRA.....	40
3.4.	FUENTES DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN.....	40
3.4.1.	Fuentes secundarias.....	40
3.4.2.	Fuentes primarias.....	40
3.5.	Instrumento de investigación.....	40
3.5.1.	Ficha de laboratorio.....	41
3.5.2.	Ficha de monitoreo.....	41
3.5.3.	Material virtual.....	41
3.6.	Procesamiento y análisis de la información.....	41
3.6.1.	Zonas de muestreo.....	41
3.10.	Pruebas bioquímicas.....	43
3.10.1.	Determinación de ureasa.....	43
3.10.2.	Determinación de la solubilización de fósforo.....	44
3.10.3.	Determinación de la solubilización de potasio.....	45
3.10.4.	Tinción Gram.....	45
3.11.	Construcción de árbol filogenético.....	46
3.12.	Prueba de antibiosis.....	46

3.13. Curva de crecimiento OD.....47

3.14. Estimación de la reducción de metales por biosorción.....47

3.12. Confrontación planta / bacteria / metal.....48

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados.....50

4.1. Aislamiento y Caracterización Bioquímica.....50

4.2. Agrupaciones filogenéticas.....52

4.3. Crecimiento celular.....53

4.4. Análisis de suelo.....56

4.5. Reducción de metales por biosorción.....57

4.6. Pruebas de inhibición bacteriológica.....58

4.7. Confrontación planta-bacteria-metal pesado.....60

4.8. Discusión.....62

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES.....66

5.2. RECOMENDACIONES.....67

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....68

ANEXOS.....74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación de puntos de muestreo.....	18
Figura 2. Agrupaciones filogenéticas.....	54
Figura 3. Crecimiento celular cepas La Maná en diferentes metales pesados..	55
Figura 4. Crecimiento celular cepas Quevedo en diferentes metales pesados.	56
Figura 5. Crecimiento celular cepas Buena Fe en diferentes metales pesados.	57
Figura 6. Concentración de metales pesados en diferentes zonas agrícolas.....	58
Figura 7. Reducción de las concentraciones de metales pesados por biosorción..	59
Figura 8. Inhibición de crecimiento radial en diferentes antibióticos comerciales.....	61
Figura 9. Las barras de error Aluminio, Zinc y Cobre.....	57
Figura 10. Efectos de los metales en el desarrollo de <i>Oryza sativa</i>	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Medio de cultivo ureasa.....	46
Tabla 2. Medio de cultivo fosfatasa.....	46
Tabla 3. Medio de cultivo Pikovskaya modificado.....	47
Tabla 4. Caracterización morfoquímica.....	53
Tabla 5. Antibiograma químico.....	60

ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Pruebas bioquímicas.....	78
Anexo 2. Crecimiento celular en aislamientos.....	80
Anexo 3. Transformación de crecimiento celular a biomasa bacteriana....	80
Anexo 4. Cultivo de <i>Oryza sativa</i> sometido a tratamientos bacterianos...81	
Anexo 5. Concentración celular UFC por mL.....	81
Anexo 6. Muestras para análisis de espectrofotometría.....	82
Anexo 7. Purificación de cepas.....	82

INTRODUCCIÓN

El suelo es un componente ambiental que por su origen, formación y evolución no puede ser aislado del entorno que lo circunda, representando, en la mayoría de ecosistemas terrestres, el medio físico-químico en el que se desarrolla la vida. Es frágil, de difícil y larga recuperación, y de extensión limitada. Por ello, un uso inadecuado del mismo puede contribuir a la degradación de este recurso natural no renovable a corto plazo (Loayza., 2020).

Se pueden distinguir diferentes fuentes de contaminación de los suelos por metales pesados dependiendo de su origen. En ocasiones, la propia naturaleza del material originario y su alteración son los responsables de la contaminación; en este caso, se denomina contaminación endógena. Otras veces los aportes contaminantes son externos, frecuentemente como resultado de actividades antropogénicas, denominándose contaminación exógena (Fuentes., 2017). El suelo se ha convertido en un medio receptor de multitud de sustancias potencialmente contaminantes. Su condición de interface entre la biosfera, la litosfera (corteza, suelo y sedimentos), la hidrosfera (agua dulce y agua de mar) y la atmósfera lo convierte en una “estación de tránsito” de los contaminantes, en la que pueden permanecer retenidos grandes períodos de tiempo o ser tan móviles que se incorporen a los demás medios y, de ahí, a las redes tróficas con los consecuentes problemas que ello acarrearía (Medrano, 2018).

Las sustancias químicas, que se emplean para la extracción de minerales, generan efluentes cargados de metales pesados como mercurio, arsénico, cromo, cadmio, hierro, plomo, y otros como el cianuro que ingresan al organismo por diversas vías de absorción y se acumulan en el tejido adiposo, y ocasionan diversos problemas de salud, que podrían llegar a generar hasta enfermedades cancerígenas (García, 2017).

Los microorganismos ofrecen muchas alternativas para la biorremediación de metales, entre las que se encuentran: La biosorción, que consiste en la inmovilización pasiva de metales por

materiales biológicos de origen diverso. Este proceso se basa en la afinidad entre el sorbente y la sustancia contaminante mediante la interacción bioquímica entre los metales y los grupos funcionales presentes en las paredes de celulares de algas, hongos, bacterias, o en otros polisacáridos como la celulosa y el quitosano (Janeta, 2018).

CAPÍTULO I.

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

Dar el ejemplo no es la principal manera de influir
sobre los demás; es la única manera.

(Albert Einstein).

1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

Los metales pesados constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales sujetos a una mayor investigación y preocupación, fundamentalmente debido a su movilidad y a las bajas concentraciones a las que comienzan a manifestar sus efectos tóxicos. En Ecuador se han identificado 11 tipos de climas ostensiblemente diferentes, lo que repercute en las concentraciones de metales pesados del suelo y la baja adaptación de los microorganismos que mantienen el equilibrio en la rizósfera.

El proyecto de investigación se desarrolló en el Cantón Quevedo de la Provincia de Los Ríos- Ecuador, en el laboratorio de biotecnología área de microbiología dicho laboratorio se encuentra ubicado en el cantón Mocache provincia de los Ríos Ecuador.

En la figura 1 se indican los puntos de recolección de muestras de suelos (P1 BUENA FE: 0°55'34.9"S 79°29'35.4"W. P2 QUEVEDO: 1°03'16.7"S 79°29'29.4"W. P3 LA MANÁ: 0°57'04.0"S 79°14'55.3"W).

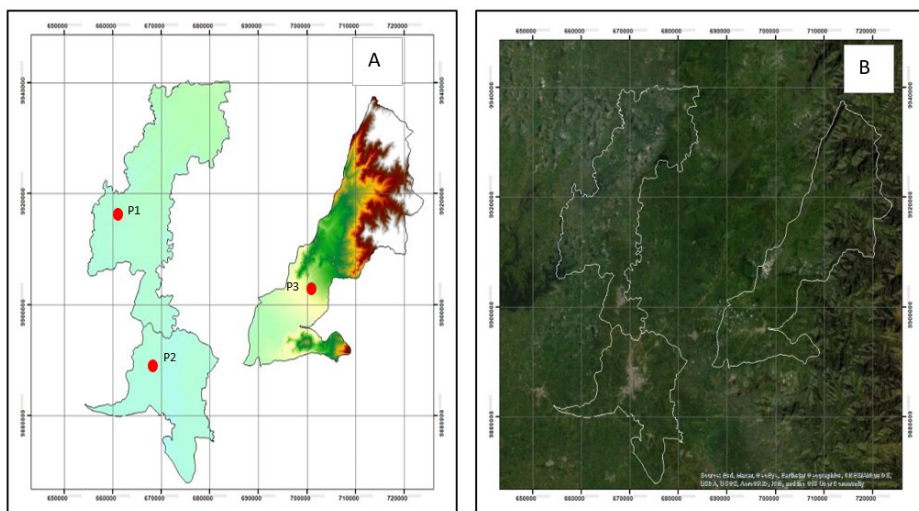


Figura 1. Ubicación de puntos de muestreo P1 (Buena Fe) P2 (Quevedo) P3 (La Mana); A: mapa de relieves B: mapa satelital

1.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA

En el sector agrícola ecuatoriano la aplicación de enmiendas basadas en productos de fermentación bacteriana se limita debido al empleo de fuentes de fermentación bajas en carbohidratos, azúcares y sales minerales donde se reducen las características físicas, químicas y biológicas de las cepas degradadoras, tales como la producción de metabolitos y la estabilidad de las unidades formadoras de colonias.

Los metales presentes en los suelos ecuatorianos de forma natural se encuentra el aluminio, hierro y magnesio constituyen parte de la corteza terrestre (7,4%, 4,7% y 2,1%) interfieren también los factores de erosión (lluvia, vegetación, propiedades del suelo) hacen que los metales se liberen y migren de las rocas a otros medios. Otra parte de los metales pesados provienen de la actividad volcánica, incendios forestales y desgaste de las placas continentales. Los metales pesados de mayor impacto son Plomo - Mercurio - Cadmio - Cromo - Arsénico que causan grandes daños en la salud y el ambiente ocasionando pérdidas en la biodiversidad y alteraciones genéticas cuando están presentes en los alimentos agrícolas. El empleo de pesticidas y el uso excesivo de agroquímicos ha ocasionado un desequilibrio eco sistémico interrumpiendo la interacción de los microorganismos con la captura y fijación de los metales pesados.

1.3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.3.1. PROBLEMA GENERAL

¿Qué tipo de bacterias se encuentran en los suelos contaminados con mercurio (Hg), zinc (Zn), aluminio (Al) y cobre (Cu)?.

1.3.2. PROBLEMAS DERIVADOS

- ¿Las bacterias recuperadas de los suelos contaminados logran reducir las concentraciones de sustancias tóxicas?

- ¿Una caracterización bioquímica permite la clasificación de diferentes grupos de bacterias aeróbicas y anaeróbicas?
- ¿Las interacciones entre bacterias y plantas generan resultados favorables en el desarrollo de células vegetales expuestas a concentraciones altas de contaminantes?

1.4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Los cantones Quevedo, Buena Fe y La Mana son sectores dedicados principalmente a la agricultura, ganadería, silvicultura y el comercio en general; que presentan condiciones ambientales y geográficas privilegiadas que la convierten en un atractivo comercial influyendo en el incremento de la demanda de productos agrícolas y por lo tanto incrementando el uso de agroquímicos que ayudan a prevenir plagas y enfermedades así mismo para suplir las demandas nutricionales de cada cultivo.

- **CAMPO:** Ciencias ambientales (Microbiología ambiental)
- **ÁREA:** Biotecnología
- **LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:** Desarrollo de soluciones tecnológicas para la gestión de residuos y promoción de energías alternativas.
- **ASPECTO:** Biodegradación
- **TIEMPO:** 1 año

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. GENERAL

Aislamiento caracterización e identificación de bacterias con potencial en la biorremediación de suelos contaminados con mercurio (Hg), zinc (Zn), aluminio (Al) y cobre (Cu).

1.5.2. ESPECÍFICOS

- Aislar bacterias nativas de suelos agrícolas contaminados con mercurio (Hg), zinc (Zn), aluminio (Al) y cobre (Cu).
- Caracterizar los grupos bacterianos recuperados del aislamiento a partir de suelos contaminados en condiciones de laboratorio.
- Comprobar la disminución de las concentraciones de contaminantes bajo enfrentamientos duales planta / bacteria.

1.6. JUSTIFICACIÓN

En Ecuador, el incremento de la minería artesanal e ilegal, ha provocado un aumento de la contaminación por metales pesados, siendo a su vez causante de graves daños en los sectores cercanos a ríos o efluentes afectando de forma directa a la agricultura que emplea el agua de los afluentes cercanos para suministro de riego. Las concentraciones de metales pesados en los suelos, producto de la cianuración y los relaves de amalgamación, tienen niveles que superan los límites establecidos según la normativa ecuatoriana. Los estudios realizados por el FUNSAD en los relaves de Vivanco (Zaruma) y Chancha Gerais (Portovelo), muestran concentraciones de niveles de plomo (Pb) (1796.8- 4060.0 mg/Kg), arsénico (As) (396.0-8800.0 mg/Kg), zinc (Zn) (513.0-2670.0 mg/Kg), cadmio (Cd) (27.0-44.1 mg/Kg), y mercurio (Hg) (1.0-35.9 mg/Kg), que rebasan el máximo permisible señalado en la norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados.

Los países como Brasil Colombia y Perú han logrado desarrollar productos biológicos con una alta eficacia en la estabilización y bioacumulación de metales pesados presentes en los suelos agrícolas, gracias al uso eficiente de la materia prima. Mientras que en el Ecuador no existen programas de enmiendas basadas en microorganismo debido a la poca información y los bajos estándares en los productos que se ofertan en el mercado, limitando el acceso a este tipo de tecnologías y aumentando los problemas de toxicidad por metales pesados.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

Ningún hombre es lo bastante bueno para
gobernar a otros sin su consentimiento.

(Abraham Lincoln)

2.1. FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL

2.1.2. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación ambiental es la introducción de sustancias u otros elementos físicos en un medio, que provocan que este sea inseguro o no apto para su uso. El medio ambiente puede ser un ecosistema, un medio físico o un ser vivo. El contaminante puede ser una sustancia química o energía (como sonido, calor, luz o radiactividad). Es siempre una alteración negativa del estado natural del medio ambiente y, por lo general, se produce como consecuencia de la actividad humana considerándose una forma de impacto ambiental (González et al., 2018).

2.1.3. SUELO

El suelo es una mezcla de materia orgánica, minerales, gases, líquidos y organismos que juntos sustentan la vida. El cuerpo de suelo de la Tierra, llamado pedosfera, tiene cuatro funciones importantes: Medio para el crecimiento de las plantas; medio de almacenamiento, suministro y depuración de agua; modificador de la atmósfera terrestre y hábitat de organismos. Todas estas funciones, a su vez, modifican el suelo y sus propiedades. El suelo también se conoce comúnmente como tierra o tierra; Algunas definiciones científicas distinguen la suciedad del suelo al restringir el término anterior específicamente al suelo desplazado (Poeplau, 2017).

2.1.4. CONTAMINACIÓN

La contaminación son sustancias en la tierra o las aguas subterráneas que son o potencialmente peligrosas para el medio ambiente o la salud humana. Está presente en ciudades, áreas rurales y regionales de todo el mundo y puede ser un legado de tiempos pasados en los que no se entendían los métodos seguros de eliminación de desechos y aún no se conocían los posibles riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Luego está

la posibilidad de una contaminación más reciente, desde cosas como productos químicos agrícolas hasta vertederos. Los sitios contaminados tienen el potencial de afectar la salud humana y el medio ambiente de diversas formas, según el tipo, la concentración y la localidad de contaminación, el mecanismo y el nivel de exposición (por ejemplo, ingestión, inhalación, etc.) (Mishra *et al.*, 2019).

21.5. SUELO CONTAMINADO

Suelo contaminado es aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso procedentes de la actividad humana, en concentración tal que comporte un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente (Marti, 2014).

La contaminación del suelo o la contaminación de la tierra como parte de la degradación de la tierra es causada por la presencia de productos químicos xenobióticos (hechos por el hombre) u otra alteración en el entorno natural del suelo. Por lo general, es causado por la actividad industrial, los productos químicos agrícolas o la eliminación inadecuada de desechos. Los productos químicos más comunes involucrados son hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos aromáticos polinucleares (como naftaleno y benzo (a) pireno), solventes, pesticidas, plomo y otros metales pesados (Yuvaraj y Mahendran, 2020).

21.6. METAL PESADO

Un metal pesado es un miembro de un grupo de elementos químicos no muy bien definido que exhibe propiedades metálicas. Se incluyen principalmente metales de transición, algunos semimetales, lantánidos, y actínidos. Muchas definiciones diferentes han propuesto basarse en la densidad, otras en el número atómico o peso atómico, y algunas en sus propiedades químicas o de toxicidad (Wei *et al.*, 2020). Hay una serie de elementos que en alguna de sus formas pueden representar un serio problema medioambiental y es común referirse a ellos con el término

genérico de “metales pesados”. En la actualidad, existen fuentes antropogénicas de metales pesados, por ejemplo, la contaminación, que los ha introducido en los ecosistemas, los combustibles derivados de la basura (no orgánica) generalmente aportan estos metales, así que se debe considerar los metales pesados cuando se utilizan los residuos como combustible (Ashraf *et al.*, 2019).

Los metales pesados tóxicos más conocidos son el mercurio, el plomo, el cadmio y el arsénico, y en raras ocasiones, algún no metal como el selenio. A veces también se habla de contaminación por metales pesados incluyendo otros elementos tóxicos más ligeros, como el berilio o el aluminio (Rai *et al.*, 2019).

21.7. GRUPOS DE METALES PESADOS

Oligoelementos o micronutrientes son los requeridos en pequeñas cantidades, o cantidades traza, por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Estos mismos elementos por encima de cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: Arsénico, boro, cobalto, cromo, cobre, molibdeno, manganeso, níquel, selenio y cinc.

Metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos conlleva disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Son principalmente: Cadmio, mercurio, plomo, cobre, níquel, antimonio y bismuto (Jara, 2018).

21.8. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación (o remediación biológica) se llama a cualquier proceso biotecnológico que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para recuperar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural. La biorremediación puede ser empleada para atacar contaminantes específicos del suelo, por ejemplo, en la degradación bacteriana

de compuestos organoclorados o de hidrocarburos. Un ejemplo de un tratamiento más generalizado es el de la limpieza de derrames de petróleo por medio de la adición de fertilizantes con nitratos o sulfatos para estimular la reproducción de bacterias nativas o exógenas (introducidas) y de esta forma facilitar la descomposición del petróleo crudo (Martínez *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que el uso de estrategias de biorremediación generalmente conduce a periodos de tratamiento mucho más prolongados que los de índole fisicoquímica. Además, a través del uso de sistemas biológicos, no se logra una remoción completa del contaminante, sino que siempre hay una fracción recalcitrante que no es degradada en el proceso (Velasco, 2017).

21.9. MICROORGANISMO

Técnicamente, un microorganismo o microbio es un organismo microscópico. El estudio de los microorganismos se llama microbiología. Los microorganismos pueden ser bacterias, hongos, arqueas o protistas. El término microorganismos no incluye virus y priones, que generalmente se clasifican como no vivos. Actualmente existe una gran discusión sobre la organización y clasificación de la vida, particularmente en el estudio de los microorganismos. La distinción básica divide a los organismos vivos en dos grupos: procariotas (células sin orgánulos unidos a la membrana interna, la monera, incluida la mayoría de los microorganismos) y eucariotas (células que contienen orgánulos unidos a la membrana, protistas, hongos, plantas y animales) (Singh *et al.*, 2018).

21.10. BACTERIA

Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos), filamentos curvados (vibrios) y helicoidales (espirilos y espiroquetas). 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 (Mateos *et al.*, 2017).

Las bacterias son imprescindibles para el reciclaje de los elementos, pues muchos pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de estas. Como ejemplo cabe citar la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, solamente la mitad de los filos conocidos de bacterias tienen especies que se pueden cultivar en el laboratorio, por lo que una gran parte (se supone que cerca del 90 %) de las especies de bacterias existentes todavía no ha sido descrita (Méheust *et al.*, 2019).

2.1.11. BACTERIA BIORREMEDIADORA

Se utilizan bacterias para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en el suelo, el agua y el aire. Para esto se distribuyen grandes cantidades de bacterias, naturales e inoñas, capaces de degradar las sustancias nocivas y materia orgánica. La bacteria es el organismo unicelular más pequeño que existe, son indispensables para la vida en la Tierra y existen en los más diversos ambientes, incluso en aquellos con las condiciones más desfavorables para la subsistencia de cualquier otro organismo vivo. Se reproducen por división celular. De una bacteria nacen dos, luego cuatro, ocho, dieciséis, treinta y dos, su crecimiento es exponencial. La gran mayoría de las bacterias son inofensivas y beneficiosas, sólo el 1% produce enfermedades, las patógenas. El ser humano tiene alrededor de 400 especies de bacterias diferentes en el aparato digestivo que le ayudan a realizar la digestión, a absorber nutrientes, a prevenir enfermedades (Wang *et al.*, 2018).

2.1.12. MEDIO DE CULTIVO

Un medio de cultivo es una técnica de laboratorio (véase microbiología) que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células,

tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas (Schnellbaecher et al., 2019). Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido. El objetivo último del cultivo es variado: antibiograma, identificación, multiplicación. Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio (Lehrich *et al.*, 2018).

2.1.13. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Comprende el estudio de la morfología colonial de la cepa (homogeneidad, tamaño, forma, color, opacidad y textura de las colonias) y su observación al microscopio (forma y tamaño celular, movilidad, etc.). En la CECT se incluye además la determinación del Gram, la catalasa y la oxidasa para células procariotas (Elzeini *et al.*, 2017).

2.1.14. BIOSORCIÓN

La biosorción es un proceso físico-químico y metabólicamente independiente basado en una variedad de mecanismos que incluyen absorción, adsorción, intercambio iónico, complejación de la superficie y precipitación. Los procesos de biosorción son muy importantes en el medio ambiente y en los procesos de biotratamiento convencionales.

Como rama de la biotecnología, la Biosorción se ha dirigido a la eliminación o recuperación de sustancias orgánicas e inorgánicas de la solución por material biológico que puede incluir microorganismos vivos o muertos y sus componentes, algas, materiales vegetales, desechos industriales y agrícolas y residuos naturales. Durante décadas, la biosorción se ha anunciado como una biotecnología de limpieza prometedora y rentable (Fomina y Geoffrey, 2018).

2.1.15. BIOTRANSFORMACIÓN

La biotransformación es un proceso mediante el cual los compuestos orgánicos se transforman de una forma a otra para reducir la persistencia y toxicidad de los compuestos químicos. Este proceso cuenta con la ayuda de una gran variedad de microorganismos y sus productos, como bacterias, hongos y enzimas. Las biotransformaciones también se pueden usar para sintetizar compuestos o materiales, si los enfoques sintéticos son desafiantes. El proceso de transformación natural es lento, inespecífico y menos productivo. Las biotransformaciones microbianas o la biotecnología microbiana están ganando importancia y se utilizan ampliamente para generar metabolitos en grandes cantidades con más especificidad (Smitha *et al.*, 2017).

2.1.16. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA

Se ocupa de comprender las relaciones históricas entre diferentes grupos de organismos a partir de la distribución en un árbol o cladograma dicotómico de los caracteres derivados (sinapomorfías) de un antecesor común a dos o más taxones que contiene aquellos caracteres plesiomórficos en común. Para reconstruir la filogenia de un grupo taxonómico (familia, género, subgénero, etc.) es imprescindible construir matrices basados en datos morfológicos y/o bioquímicos (producción enzimática). Las matrices son analizadas con determinados algoritmos que permiten encontrar los árboles filogenéticos, más cortos siguiendo el principio de parsimonia que supone la menor cantidad de cambios bajo el supuesto de que la evolución acontece de la manera más simple (Morrone, 2000).

2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.2.1. BIOSORCIÓN DE COBRE EN SISTEMA POR LOTE Y CONTINUO CON BACTERIAS AEROBIAS INMOVILIZADAS EN ZEOLITA NATURAL (CLINOPTILOLITA)

En el presente trabajo se estudió la biosorción de cobre utilizando bacterias aisladas del río San Pedro, Sonora, México. Se aislaron 123 cepas bacterianas en tres muestreos realizados en diferentes épocas del año y se seleccionaron *Escherichia coli* y *Burkholderia cepacia* para realizar pruebas de biosorción en lote, las cuales presentaron un 73 % de biosorción del cobre, en 75 minutos, mientras que, al utilizar zeolita sin activar como soporte de la bacteria, se obtuvo un 75 % de biosorción en el mismo tiempo. Las pruebas de biosorción en continuo se realizaron durante 28 días en un reactor aerobio de flujo ascendente empacado con zeolita (RAEFA-EZ), el cual fue inoculado con un consorcio de 10 cepas seleccionadas debido a que se desarrollaron en un medio ácido y se mantuvo en recirculación hasta obtener 1g/L de biomasa, posteriormente se alimentó con solución sintética de cobre a 50 mg Cu(II)/L, flujo de alimentación de 2.5 mL/min, flujo de aire a 36 mL/min, tiempo de retención hidráulico (TRH) de 0.87 días, temperatura a 30 °C y pH entre 3–4. La capacidad de biosorción de RAEFA-EZ fue de un 97 % en el primer día de experimentación y finalmente llega a la saturación a partir del onceavo día. Se concluye que la biomasa activa utilizada es capaz de biosorber metales pesados como el cobre y la zeolita utilizada sin activar sólo sirvió como soporte de la biomasa (Monge *et al.*, 2008).

2.2.2. EVALUACIÓN DE LA BIOSORCIÓN DE COBRE (CU) MEDIANTE ADSORBENTES BACTERIANOS PROVENIENTES DEL CANAL LOS ÁNGELES DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ

Las ciudades ejercen una gran presión sobre los recursos naturales, el hombre en su afán de deshacerse de los diferentes tipos de residuos generados en su cotidiano vivir muchas veces no es consciente del alcance perjudicial que tiene para el medio

ambiente el mal manejo de los mismos, en el caso del Canal Los Ángeles de la ciudad de Bogotá este funciona como receptor de agua lluvia así como de gran cantidad de residuos sólidos, de aguas residuales de tipo doméstico e industrial, presentando un alto grado de contaminación por vertimientos, para el desarrollo de este proyecto de investigación se tuvo en cuenta la contaminación por cobre (Cu), que fue confirmada mediante el uso de la técnica del colorímetro en laboratorio en las distintas muestras de agua residual del canal, así mismo también se confirmó el potencial biosorbente de cobre de cepas aisladas provenientes del mismo, como una alternativa tecnológica prometedora de recuperación de metales pesados en las aguas residuales (Quiroga, 2018).

2.2.3. ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS MEDIANTE BIOSORCIÓN: DESARROLLO DE PROCESOS DE TRATAMIENTO PARA AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES

En la elaboración de esta Tesis Doctoral se ha fijado como objetivo el tratamiento de aguas residuales industriales con un doble objetivo medioambiental, y con el concepto de economía circular como eje vertebrador. En primer lugar, se persigue el aprovechamiento de un residuo autóctono (el orujillo) convirtiéndolo en un recurso (material biosorbente), por otra parte, se trata de eliminar sustancias nocivas antes de que sean vertida al medio, particularmente, metales pesados presentes en aguas residuales industriales. Con la eliminación de estos metales se están eliminando del medioambiente alguno de los elementos más tóxicos y nocivos, y a su vez, unas de las sustancias más persistentes en la naturaleza. A lo largo de los diferentes capítulos de la tesis se han ido demostrando diversas aplicaciones reales del orujillo en lo referente a eliminación de metales pesados de aguas residuales industriales. Además de demostrar la validez del orujillo para diferentes tipologías de aguas, se ha llevado a cabo el escalado del proceso a planta piloto y se ha comprobado la validez del material en ciclos de regeneración. De esta forma se han conseguido analizar todos los aspectos necesarios para comprobar la validez del método a escala industrial. Por último,

también se estudió la valorización del orujillo hidrolizado saturado en metales, tras la biosorción (Fernández, 2020).

2.2.4. BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A LOS GÉNEROS CYPERUS Y PASPALUM EN SUELOS CONTAMINADOS CON MERCURIO

Se utilizaron muestras de tejidos vegetales para el aislamiento y la determinación poblacional de bacterias endófitas. La resistencia a mercurio in vitro de los aislados, se evaluó en agar nutritivo suplementado con HgCl_2 ; los aislados resistentes fueron identificados, a nivel molecular. La concentración de mercurio total en el suelo de Mina Santa Cruz fue de $4,7\text{mg kg}^{-1}$. Las especies vegetales colectadas fueron *Paspalum arundinaceum*, *Cyperus luzulae* y *Cyperus laxus*. La mayor concentración de mercurio en los tejidos vegetales fue encontrada en raíz, con un rango de $1,5$ a $3,8\text{mg kg}^{-1}$. Las especies *P. arundinaceum* y *C. laxus* presentaron las mayores densidades poblacionales de endófitas en sus tejidos 1×10^8 UFC, aproximadamente. Se aislaron siete bacterias endófitas resistentes, a concentraciones de 350 y 400 ppm de mercurio (Pérez, 2016).

2.2.5. BIORREMEDIACIÓN DE MERCURIO Y NÍQUEL POR BACTERIAS ENDÓFITAS DE MACRÓFITAS ACUÁTICAS

Se cuantificó las densidades poblacionales de estas bacterias y su respectiva tolerancia a los metales pesados níquel y mercurio. Posteriormente, las cepas tolerantes fueron identificadas molecularmente y se les evaluó su capacidad de promover el crecimiento vegetal. Un total de 182 morfotipos de bacterias endófitas fueron aislados, los mayores promedios de densidad poblacional se obtuvieron en las macrófitas de la ciénaga de San Benito Abad. Los mayores promedios de morfotipos tolerantes a mercurio y níquel se encontraron en la ciénaga de Ayapel en las coordenadas $8\ 18\ 51.10''\ \text{N}$ y $75\ 8\ 8.26''\ \text{O}$. Los resultados muestran que los aislados con mayor potencial biotecnológico son BAT6, BAR2 y PAT2, donde los dos primeros tienen una homología del 100% con la especie *Lysinibacillus fusiformis* y el género *Enterobacter*,

respectivamente, mientras que el tercer aislamiento tuvo una homología del 96% con la especie *Burkholderia cepacia*. El presente estudio reporta por primera vez la presencia de *Lysinibacillus fusiformis* y *Burkholderia cepacia* asociadas a macrófitas en cuerpos cenagosos de Sucre y Córdoba (Torres *et al.*, 2019).

2.2.6. CONTRIBUCIÓN DE LAS BACTERIAS SOLUBILIZANTES DE ZINC EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO Y EL CONTENIDO DE ZINC DEL TRIGO

Este estudio se llevó a cabo para seleccionar rizobacterias solubilizantes de zinc aisladas de trigo y caña de azúcar, y analizar su efecto sobre el crecimiento y desarrollo del trigo. Se identificaron y caracterizaron bioquímicamente catorce exopolisacáridos productores de cepas bacterianas de trigo, así como sobre la base de secuencias del gen 16S rRNA. Junto con estos, también se analizaron 10 aislados de caña de azúcar identificados para determinar la capacidad de solubilización del zinc en cinco fuentes diferentes de zinc insoluble. De 24, cinco cepas, es decir, EPS 1 (*Pseudomonas fragi*), EPS 6 (*Pantoea dispersa*), EPS 13 (*Pantoea agglomerans*), PBS 2 (*E. cloacae*) y LHRW1 (*Rhizobium* sp.) Se seleccionaron (basándose en sus actividades de solubilización de zinc y PGP) para experimentos de plantas a escala de maceta. Se utilizó $ZnCO_3$ como fuente de zinc y se inocularon plántulas de trigo con estas cinco cepas, individualmente, para evaluar su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. El efecto sobre las plantas se analizó con base en parámetros de crecimiento y cuantificando el contenido de zinc de brotes, raíces y granos mediante espectroscopía de absorción atómica. El experimento de la planta se realizó en dos conjuntos. Mientras que el contenido máximo de zinc para las raíces se cuantificó en las plantas de control, lo que indica la incapacidad de la planta para transportar zinc a los granos, lo que respalda la biodisponibilidad acelerada de zinc para plantar granos con rizobacterias solubilizadoras de zinc (Kamran *et al.*, 2017).

2.2.7. TOXICIDAD BACTERIANA DEL NANOANTIBIÓTICO DE ÓXIDO DE ZINC VERDE BIOMIMÉTICO Y LA INTERFAZ NANOCOLOIDE-BACTERIA

Este estudio tuvo como objetivo llenar el vacío crítico de conocimiento sobre la interacción entre las nanopartículas de óxido de zinc verde (ZnONP) y la interfaz bacteriana. Se produjeron ZnONP en fase de wurtzita con una energía de banda prohibida de 3,28 eV mediante la explotación de un método de biosíntesis simple y ecológico utilizando un precursor económico de A. indica extracto de hoja y nitrato de zinc. Las ZnONP retuvieron los grupos funcionales de las plantas respaldando su carácter hidrófilo. La actividad antibacteriana y antibiofilm de ZnONPs fue significativa ($p \leq 0.05$) y la CMI / MBC frente a los aislamientos clínicos más frecuentes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* varió de 0,5 a 1,0 (CMI) / 1,0 a 1,5 mg ml⁻¹ (MBC). La disolución de ZnONP en Zn²⁺ Los iones en un medio nutritivo aumentaron como resultado de la interacción con la superficie bacteriana y los metabolitos. La unión sustancial a la superficie de las ZnONP seguida de la captación intracelular interrumpió la morfología celular y provocó una lesión obvia en la membrana celular. La cinética de crecimiento bacteriano interrumpida, la pérdida de la respiración celular, la producción mejorada de ROS intracelulares y la fuga del contenido citoplásmico sugirieron inequívocamente una fuerte interacción de ZnONP con la superficie celular exterior y los componentes intracelulares (Ahmed *et al.*, 2019).

2.2.8. BACTERIAS ASOCIADAS COMO UNA HERRAMIENTA POTENCIAL PARA FACILITAR LA FITOESTABILIZACIÓN DE PILAS DE DESECHOS CONTAMINADOS CON ZINC Y PLOMO

Los metales pesados en el suelo, como agentes selectivos, pueden cambiar la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a las plantas y sus propiedades metabólicas, lo que lleva a la selección de las cepas más adaptadas, que podrían ser útiles en la fitorremediación. *Trifolium repens*, un excluidor de metales

pesados, se encuentra naturalmente en los montones de desechos de las minas de metales en el sur de Polonia caracterizados por altas concentraciones totales de metales. En total, se aislaron 113 cepas cultivables y se utilizaron para la secuenciación del gen Sanger del ARNr 16S a fin de determinar su afiliación genética y para las pruebas in vitro de sus rasgos de promoción del crecimiento de las plantas. La riqueza taxonómica y la diversidad fenotípica en las comunidades de origen metalífero fueron significativamente menores ($p < 0,0001$) en comparación con las del sitio de referencia. Se pueden considerar dos cepas, *Bacillus megaterium* BolR EW3_A03 y *Stenotrophomonas maltophilia* BolN EW3_B03, aisladas de un montón de desechos de minas de Zn-Pb que dieron positivo para todos los rasgos de promoción del crecimiento de plantas examinados y que mostraron co-tolerancia a Zn, Cu, Cd y Pb como potenciales facilitadores de la fitoestabilización (Oleńska *et al.*, 2020).

2.3. 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.

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

Lo que importa verdaderamente en la vida no son los
objetivos que nos marcamos, sino los caminos que
seguimos para lograrlo

(Peter Bamm).

3.1. LOCALIZACIÓN

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “La María”, ubicado en el Km 7 vía Quevedo – El Empalme, cuyas coordenadas geográficas son las siguientes: 79 27” de longitud Oeste y 1 06” de latitud Sur a una altitud de 67 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: velocidad de crecimiento y concentración celular por ml. A través del análisis en laboratorio se procederá a la identificación de las características de crecimiento bacteriano 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 evaluación, identificación y selección de los parámetros de fermentación adecuados aplicando postulados pertinentes y adecuados basados en las características morfológicas de las cepas bacterianas.

3.3.2. DEDUCTIVO

Permitirá evaluar los tiempos de resistencia y la capacidad de desarrollarse en condiciones desfavorables.

3.3.3. OBSERVACIÓN CIENTÍFICA

Se usará 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.

3.3.4. MUESTRA

Las muestras fueron tomadas de cada zona descrita en los putos de recolección, estas muestras fueron almacenadas en condiciones óptimas para no afectar los parámetros que puedan interferir en los procesos de evaluación.

3.4. FUENTES DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

3.4.1. FUENTES SECUNDARIA

En las fuentes o informaciones secundarias se uso enciclopedias, antologías, directorios, libros o artículos que interpretan otros trabajos que validen todos los procesos de la investigación.

3.4.2. FUENTES PRIMARIAS

En las fuentes primarias se usó 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 riegos dentro del área de trabajo.

3.5. INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

3.5.1. FICHA DE LABORATORIO

Se recolectó toda la información relativa a la identificación de microorganismos causantes de la enfermedad, aislamiento selección e identificación de los mismos, entre otros aspectos básicos de la investigación.

3.5.2. FICHA DE MONITOREO

Sirvió para el registro de la información relativa al monitoreo de los procesos de la investigación donde se evaluarán: número de muestras, peso de las muestras, transporte y tiempo de almacenamiento de muestras, y demás aspectos relativos al monitoreo del suelo y el desarrollo de los microorganismos.

3.5.3. MATERIAL VIRTUAL

Se emplearon plataformas virtuales de bioinformática; InfoStat, MEGA11® para la generación de árboles filogenéticos basados en caracteres bioquímicos y Mendeley para el procesamiento de los datos y obtención de resultados.

3.6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

La información fue procesada en el programa estadístico InfoStat cada tratamiento evaluado fue sometido a las pruebas de ANAVA empleado 3 repeticiones por cada tratamiento y 2 unidades experimentales en condiciones corladas adicionalmente se empleó pruebas de rango múltiple de DUNCAN para determinar las diferencias y similitudes entre los tratamientos.

3.6.1. ZONAS DE MUESTREO

Se escogieron las zonas de muestreo que presentaron en sus registros, cultivo intensivo específicamente maíz, arroz, banano y

cacao los cuales demandan una gran cantidad de agroquímicos para la producción y en sus suelos se acumulan las sustancias tóxicas.

3.7. AISLAMIENTO DIRECTO DE BACTERIAS RESISTENTES A METALES PESADOS

Para obtener células bacterianas, se pesaron 2 g de suelo en Matraz de 50 ml, mezclado con 20 ml de agua destilada y luego se mantuvo en un agitador rotatorio con una velocidad de 150 rpm a 30 °C durante 30 min. Se prepararon placas de agar de levadura triptófano peptona glucosa (YTPG) (en concentración por litro: 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g glucosa, 30 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,5 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 g de agar) con 3 mg / ml de cicloheximida (Sigma-Aldrich Co., EE. UU.), suplementado con metales pesados en las siguientes concentraciones: HgCl_2 , 100, 150, 200, 250, 300 ppm; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mM, Cu a 25, 30, 35, 40 y 45 ppm: y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)$ a 100, 200, 300, y 400 ppm, que se utilizaron para aislar cepas de bacterias tolerantes. Posteriormente se usó 0,1 ml del sobrenadante bacteriano líquido del suelo paqueado en el agar gelificado. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 a 7 días (Xie *et al.*, 2018).

3.8. ESTABLECIMIENTO DE MORFOLOGÍA COLONIAL BACTERIANA

Se observaron parámetros macroscópicos para tipificar la morfología macroscópica en agar solidificado en placa, donde se aprecia la abundancia de crecimiento: La cantidad de crecimiento se reporta como ninguno, escaso, moderado o abundante. También se analiza la pigmentación: Microorganismos cromogénicos son aquellos que pueden producir pigmentos intracelulares que son los responsables del color de las colonias. Otros organismos producen pigmentos solubles extracelulares, que son excretados dentro del medio y esto también produce color (Aparicio, 2018).

Como último factor se determina la forma visualizando la apariencia de la estría de crecimiento en la superficie del agar se designa

como: Filiforme: Continua y en forma de hebra con bordes suaves. Equinulada: Continua, en forma de hebra con bordes irregulares. Perlada: Colonias que no concluyen o semifluyen. Difusa: Delgada y crecimiento extenso. Arborescente: Crecimiento en forma de árbol. Rizoides: Crecimiento en forma de raíz.

3.9. DETECCIÓN PRIMARIA DE BACTERIAS RESISTENTES A METALES PESADOS

Para el cribado selectivo de bacterias resistentes a metales pesados, se usaron 300 µg / mL de metales pesados los cuales se incorporaron a placas de agar LB (Luria Bertani) (peptona 10,00 g / L, extracto de levadura, 5,00 g / L, NaCl 5,00 g / L, dextrosa anhidrato 10,00 g / L y agar 30,00 g / L: pH -7,00) y se tamizaron mediante el método estándar de vertido en placa observado a 37 ° C. Después de 24 h de incubación, se observó en las placas cualquier tipo de desarrollo en el medio de cultivo. Después de la selección preliminar de muestras de suelos que contienen bacterias que degradan metales pesados, se realizó una dilución en serie para aislar las bacterias deseadas (Marzan *et al.*, 2017).

Se siguió la técnica de la placa de estriado durante el aislamiento. Las placas de control también se prepararon con medio LB sin incluir ningún metal pesado para hacer comparaciones. Las colonias que diferían en características morfológicas se seleccionaron, recogieron, purificaron y luego se conservaron en diferentes placas para estudios adicionales.

3.10. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

3.10.1. DETERMINACIÓN DE UREASA

Medio utilizado para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica. Se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan urea. En el medio de cultivo, la triptéina y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH. El agar es el agente solidificante. Las bacterias

hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberan amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio de cultivo haciendo virar el indicador rojo de fenol del color amarillo al rojo (Zuluaga y Martínez., 2018).

Tabla 1. Medio de cultivo ureasa

Compuesto	Concentración
Tripteína	1 g/L
Glucosa	1 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Fosfato monopotásico	2 g/L
Rojo de fenol	0.012 g/L
Agar	15 g/L
pH final	6.8 ± 0.2

3.10.2. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO

El medio de cultivo sólido utilizado fue un indicador cualitativo de la acción solubilizadora de fosfatos de las Rizobacterias promotoras del crecimiento donde se puede observar al formarse un halo claro alrededor de la cepa bacteriana y cambio de color.

Tabla 2. Medio de cultivo fosfatasa

Compuesto	Concentración
Sulfato de amonio	0.5 g/L
Cloruro de potasio	0.2 g/L
Sulfato de magnesio	0.1 g/L
sulfato de manganeso	0.004 g/L
Cloruro de sodio	0.2 g/L
D-Glucosa	10 g/L
Sulfato de hierro	0.002 g/L
Extracto de levadura	0.5 g/L
Solución de fosfato	0.5 ml/L
Fosfato de calcio	0.5 g/L
Fosfato férrico	0.5 g/L
Agar	18 g/L

3.10.3. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE POTASIO

El medio específico para el aislamiento y desarrollo de los microorganismos solubilizadores de potasio que se utilizó fue una modificación de la composición del medio Pikovskaya, del Laboratorio de Microbiología de Suelos y Medio Ambiente de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia (Callejas et al., 2018).

La composición del medio Pikovskaya modificado empleado se detalla a continuación:

Tabla 3. Medio de cultivo Pikovskaya modificado

Compuesto	Concentración
Glucosa	10 g/L
Nitrato de potasio	5 g/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
Púrpura de Bromocresol	0.125 g/L
Agar 15 g/L	pH 7.0 ± 2

3.10.4. TINCIÓN GRAM

Para realizar la tinción, se procedió a crecer los microorganismos en medio de cultivo King B sólido. Dichos microorganismos se los inoculó mediante la técnica de siembra de estría múltiple, incubándolos por 24 horas a 37°C para obtener colonias diferenciadas. Luego se realiza un frotis del microorganismo, para ello hay que añadir una gota pequeña de agua destilada y extender en porta objeto y dejarla secar, luego se fijó la muestra mediante un alcohol (metanol). Para el proceso de tinción de aplico el tinte de violeta de genciana sobre el portaobjetos y espero un minuto, transcurrido el tiempo se procedió a enjuagar la muestra con agua

para aplicar un fijador del violeta de genciana (lugol). Aplicado el fijador las muestras se lavaron de nuevo con una mezcla de alcohol y acetona durante unos segundos. Finalmente se aplicó una tinción de safranina o fucsina para distinguir las Gram negativas que aparecerán bajo el microscopio (en lugar de incoloras) con un tono rosado o rojo (Rodríguez y Arenas., 2018).

3.11. CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOL FILOGENÉTICO

Para el análisis de conglomerado se emplearon los datos morfológicos y bioquímicos quienes se llevaron a una matriz binaria conformada por datos de 1 y 0 posteriormente se transformaron en matriz genética conformada por A (adenina) y T (timina) para poder ser procesados en Mega® versión 11.0 con el método de máxima verosimilitud de neighbor-joining que permitió la formación de conglomerados que denotan las asociaciones más próximas entre aislamientos de las diferentes localidades, dicha matriz fue procesada mediante archivo FASTA para la generación de un árbol filogenético que permitió la agrupación y discriminación de cepas en base a sus tipologías evolutivas.

3.12. PRUEBA DE ANTIBIOSIS

Se empleó un antibiograma de discos distribuidos de forma organizada en los 4 cuadrantes de las cajas Petri, la técnica consiste en el empleo de diferentes antibióticos con la finalidad de medir el diámetro del halo formado por la zona de inhibición del crecimiento de bacterias alrededor del disco en medio de cultivo sólido, para la ejecución de la técnica se empleó, ampicilina, penicilina, cloranfenicol y tetraciclina en las dosis de 500 mg/L con un periodo de incubación de 96 horas a 28 ± 1 °C. Los halos fueron observados llevando un registro fotográfico de cada tratamiento (Tondin *et al.*, 2018).

3.13. CURVA DE CRECIMIENTO OD

Del pre inculo obtenido, se tomó con una micropipeta de precisión 1 ml de cada una de las bacterias y se colocaron individualmente en un matraz Erlenmeyer con 99 ml de medio de cultivo King B (1% v/v), (King et al. 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agua destilada (pH 7.2)], este procedimiento se repitió para cada una de las bacterias en estudio.

Se incubaron las bacterias a 26 °C a 150 rpm en un shaker Benchmark incubshaker® y se determinó la O.D. (Densidad óptica) y la concentración celular o células por mililitro (UFC unidades formadoras de colonia/ml) con intervalos de dos horas durante 24 horas.

La O.D. se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro marca Unico® bw-54 a 600 nm de longitud de onda (OD₆₀₀ nm), se utilizaron cubetas de cuarzo en las cuales en una cabina de flujo laminar se colocaron con la ayuda de una micropipeta 3 ml de la muestra del medio incubado, usando como control medio de cultivo King B sin inoculante. Se repitió este proceso para cada una de las bacterias en estudio (Rodríguez., 2018).

Para el ensayo se incubaron por separado las cepas que obtuvieron el mejor crecimiento en la detección primaria de bacterias resistentes a metales pesados, posteriormente se determinó las curvas de crecimiento mediante espectrofotometría a 650 nm en los mismos periodos de siembra (3 horas), para realizar una comparación entre el crecimiento celular por turbidez del medio de cultivo., Los tratamientos bacterianos se desarrollaron en medio de cultivo M9 a los cuales se añadió diferentes concentraciones de metales pesados.

3.14. ESTIMACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE METALES POR BIOSORCIÓN

Se hicieron prosperar las cepas bacterianas que presentaron los valores más altos de crecimiento en medio de cultivo enriquecido

con metales pesados, para la estimación de biosorción se empleó medio de cultivo M9 [(Na₂HPO₄ 5.8 g/L; KH₂O₄ 3.0 g/L; NaCl 0.5 g/L; NH₄Cl 1.0 g/L; Agar 15 g/L; pH 6.7 ± 2; H₂O 1000 mL.)] adicionando concentraciones de HgCl₂ 18 ppm; ZnSO₄ 35 ppm; Cu 15 ppm; y Al₂(SO₄) 40 ppm. Los análisis fueron procesados en laboratorio externo con evaluaciones a las 0, 24, 48 y 72 horas pos inoculación.

3.15. CONFRONTACIÓN PLANTA / BACTERIA / METAL

Para determinar la reducción de las concentraciones de metales pesados se empleó un método indirecto que consiste en la interacción de planta bacteria y metal donde se evaluó las características agronómicas del cultivo de arroz. Los ensayos se realizaron empleando cultivos bacterianos crecidos en King B liquido (1% v/v), (King *et al.*, 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agua destilada (pH 7.2)], por 24 horas a 28 °C sobre un agitador orbital para facilitar el desarrollo de células viables. También se preparó suelo franco arcilloso previamente esterilizado el cual se agregó en contenedores plásticos en proporción de 50 gramos por unidad, rápidamente se llevó el suelo a capacidad de campo, con las soluciones de metales pesado en concentraciones de; HgCl₂ 18 ppm; ZnSO₄ 35 ppm; Cu 15 ppm; y Al₂(SO₄) 40 ppm, transcurrido un periodo de 5 horas, se procedió a la inoculación de 2 mL de los cultivos bacterianos en concentración de 1x10⁻⁸ UFC finalmente se adicionaron semillas de arroz comercial las cuales se dejaron crecer por un periodo de 3 semanas para posteriormente evaluar el crecimiento y desarrollo en condiciones de contaminación por metales pesados.

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSION

Todo lo que yo invento todo lo que yo imagino, quedará siempre más allá de la verdad, porque llegará un momento en que las creaciones de la ciencia superarán a las de la imaginación.

Julio Verne.

4. RESULTADOS

4.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Los datos morfológicos determinaron que el 39% de la población evaluada corresponde a una forma circular, un 3% con morfología puntiforme y un 58 % con morfología granular. Las morfologías bacterianas evidenciaron las diferentes agrupaciones presentes en los cultivos celulares iniciales. Las predominancias en las elevaciones bacterianas fueron convexa y elevada con un 35% de la población respectivamente, mientras que los valores más bajos se presentaron en prominencia plana con un 29 %.

La tinción Gram permitió evidenciar la presencia de un 35% de bacterias Gram negativas del total de la población aislada en los suelos agrícolas del cantón Quevedo La Mana Y Buena Fe correspondiente a las cepas (LM1, LM6, LM8, QV1, QV2, QV5, QV8, QV9, QV11, BF2, BF5, BF6, BF7 y BF9). La actividad productora de catalasa se detectó en 13 cepas que representan el 42% de la población aislada, la eliminación de H_2O_2 en los 13 aislados fue de reacción moderada permitiendo la formación de $2H_2O$ Y O_2 .

Se determinó la degradabilidad de componentes minerales mediante la presencia de enzimas hidrolíticas (Ureasa, Fosfatasa y Almidonasa) destacado las cepas (QV1, QV2, QV7, QV8, QV9, QV1, QV11 y BF9) para la transformación de urea en amoníaco (NH_3) mediante la inserción de ureasa por hidrolisis. La determinación de la enzima fosfatasa, permite revelar la presencia de cepas fosfato reductoras (LM2 y LM3) quienes mostraron reacción acelerada en a la producción de fosfatasas extracelulares.

Tabla 4. Caracterización morfoquímica

CEPA	ZONA	FORMA			ELEVACIÓN			FORMA DE BORDE			TINCIÓN GRAM	CATALASA	SOLUBILIZACIÓN			FLUORES
		CR	PT	GN	CV	EV	PN	ET	OD	DD			URE	FOS	ALM	
LM1	La Maná	+				+		+			-	+	-	-	-	+
LM2	La Maná			+	+				+		+		-	++	-	
LM3	La Maná			+	+				+		+		-	++	+	
LM4	La Maná						+				+		-	+	-	
LM5	La Maná				+						+		-	+	+	+
LM6	La Maná			+	+				+		-		-	-	+	
LM7	La Maná			+	+					+	+		-	-	+	+
LM8	La Maná			+	+				+		-		-	-	-	
LM9	La Maná						+				+		-	+	++	
LM10	La Maná			+			+				+		-	+	+	
QV1	Quevedo	+				+		+			-	+	+	-	+	+
QV2	Quevedo	+				+		+			+	+	+	-	++	
QV3	Quevedo			+			+		+		+		-	-	-	
QV4	Quevedo			+			+		+		+	+	-	-	-	
QV5	Quevedo	+				+		+			-	+	-	-	+	+
QV6	Quevedo			+	+				+		+		-	+	+	
QV7	Quevedo			+	+				+		+		+	-	+	
QV8	Quevedo	+				+		+			-	+	+	+	+	+
QV9	Quevedo	+				+		+			+	+	+	-	++	
QV10	Quevedo			+			+		+		+		+	-	+	
QV11	Quevedo	+				+		+			-	+	+	-	+	+
BF2	Buena Fe	+				+		+			-	+	-	-	++	+
BF3	Buena Fe			+	+				+		-		-	-	+	
BF4	Buena Fe			+	+				+		+		-	-	++	
BF5	Buena Fe		+				+			+	-		-	-	+	
BF6	Buena Fe	+					+		+		-		-	-	+	
BF7	Buena Fe	+				+		+			-	+	-	-	++	+
BF9	Buena Fe	+				+		+			-	+	+	-	++	+
BF11	Buena Fe			+			+		+		+	+	-	-	+	
CHA0	Chile	+				+		+			-	+	+	-	+	+
3-8	Ecuador			+	+				+		-		-	-	-	

CR: Circular, PT: Puntiforme, GN: Granular, CV: Convexa, EV: Elevada, PN: Plana, ET: Entera, OD: Ondulada, DD: Dentada, URE: Ureasa, FOS: Fosfatasa, ALM: Almidón. +: Producción normal, ++: producción moderada, -: Gram negativa

4.2. AGRUPACIONES FILOGENÉTICAS

El dendrograma de la figura 2 logra diferenciar 2 grupos (A y B) asociados por máxima verosimilitud de Neighbor-joinin. El primer grupo (A) presenta un nivel de similitud de un 94% aproximadamente, generando un conglomerado (extremo superior) que se integra por las cepas (BF3, BF4N LM6, QV7, LM5, LM3, QV6, LM2 y LM8) asociados al control identificado *Serratia Marcescens* 3-8. El segundo conglomerado compuesto por (LM7, LM9, BF6, LM4, LM10, QV3, QV10, QV4 y BF11) quienes comparten caracteres morfológicos distintivos en forma de la colonia granular y elevación convexa. El segundo grupo (B) se conforma por el tercer conglomerado integrado por las cepas (BF5, BF2, BF7, QV5, LM1, QV8, QV1, QV2, QV9, QV11 y BF9) asociadas a los caracteres bioquímicos de *Pseudomonas protegens* CHA0 quienes se agrupan principalmente por su forma granular, producción de ureasas y la degradabilidad de almidón.

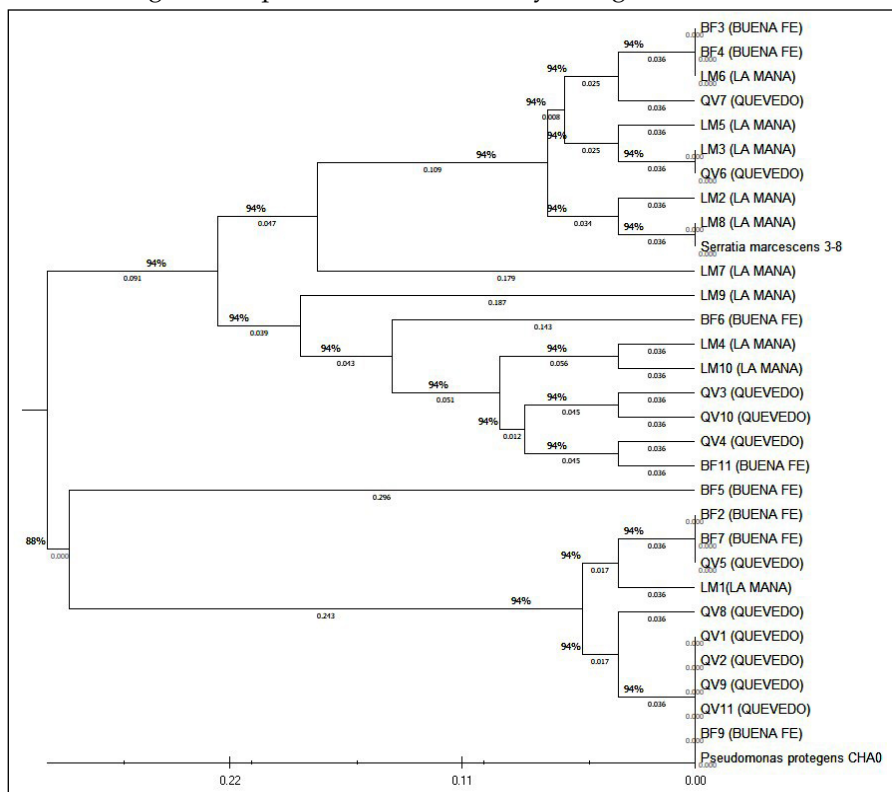


Figura 2. Agrupaciones filogenéticas basada en la técnica de máxima verosimilitud de neighbor-joining mediante caracteres fisicoquímicos.

4.3. CRECIMIENTO CELULAR EN MEDIO CONTAMINADO CON ZINC, ALUMINIO, COBRE Y MERCURIO

La cepa LM1 exhibió los promedios más altos de absorbancia en condiciones de contaminación directa con zinc, reflejando un valor de 1,59 seguida de la cepa LM10 que alcanzó un valor de 1,135. Mientras las cepas LM9 y LM8 no mostraron crecimiento alguno. En relación a las otras evaluaciones de resistencia a cobre, aluminio y mercurio, presentaron valores por debajo de los demás tratamientos realizados con las cepas obtenidas de las zonas de Quevedo y Buena Fe.

Los niveles de crecimientos más bajos se presentaron ante la exposición de mercurio logrando una reducción en el desarrollo celular de hasta el 100% en las cepas LM9, LM7, LM6, LM3 y LM2.

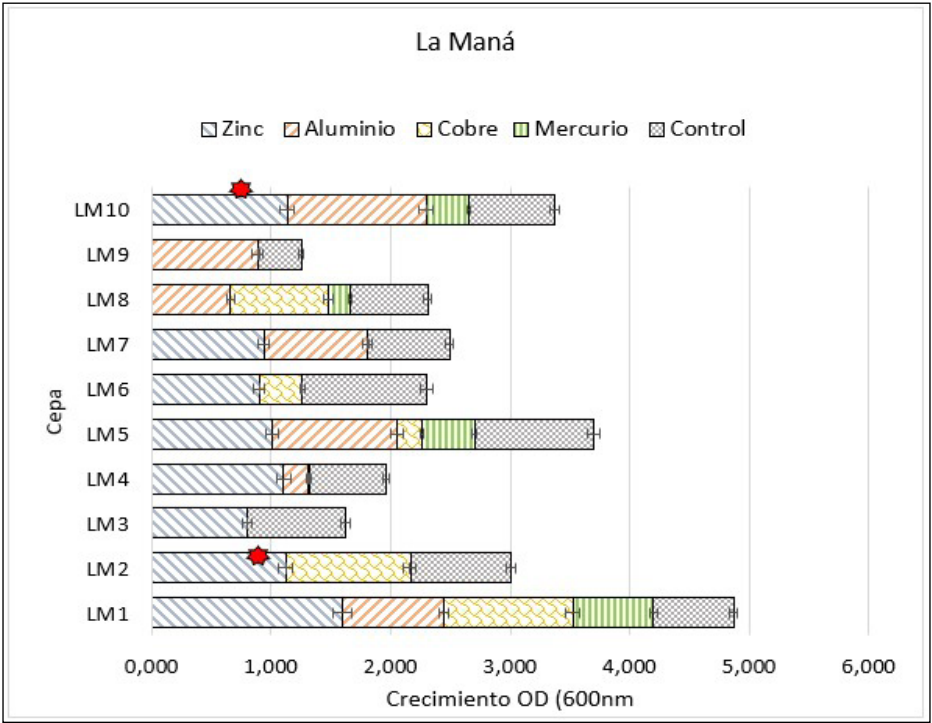


Figura 3. Crecimiento celular aislamientos bacterianos cantón La Maná en diferentes metales pesados (Zinc, Aluminio, Cobre y Mercurio). Las barras de error indican $\pm$ DE.

Las cepas QV8 y QV2 alcanzaron los valores más altos de crecimiento en relación a los demás tratamientos de contaminación por zinc con promedios de 1,45 y 1,43 respectivamente, en el ensayo de cobre se destacaron las cepas QV5, QV8 y QV11 con medias de 1,51 - 1,47 y 1,14 proporcionalmente, mientras que en las demás cepas no existió inhibición de crecimiento. También se evidencio elevada carga celular en el tratamiento de Mercurio correspondiente a las cepas QV8 y QV9 con promedios de 0.75 y 0.69 consiguiendo los valores más altos de los aislados de la zona de Quevedo.

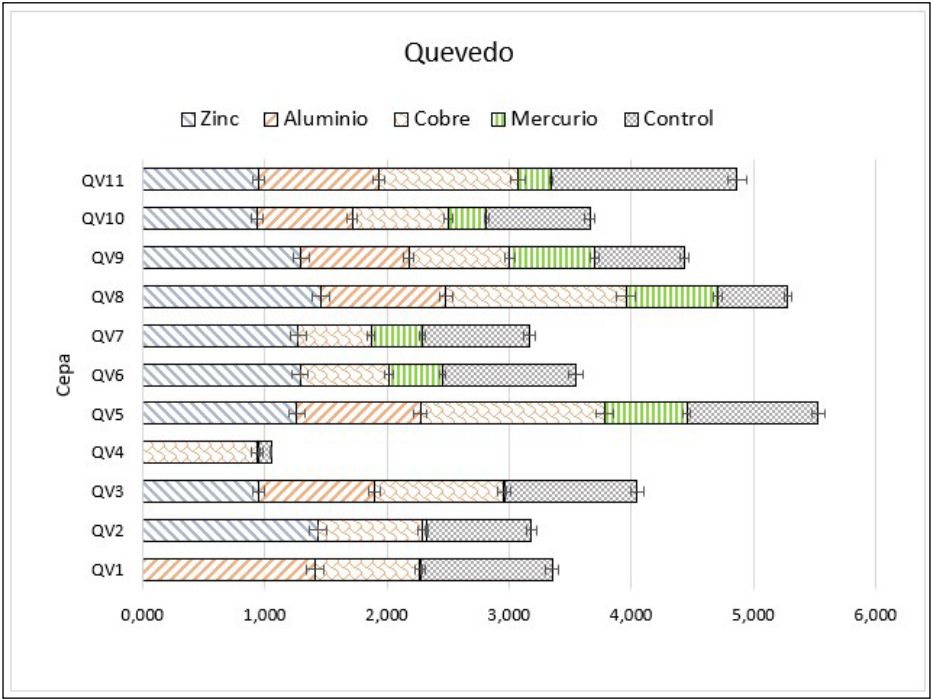


Figura 4. Crecimiento celular aislamientos bacterianos cantón Quevedo en diferentes metales pesados (Zinc, Aluminio, Cobre y Mercurio). Las barras de error indican $\pm$ DE.

En el tratamiento correspondiente a mercurio se destacó la cepa BF7 alcanzando los valores más altos con respecto a las demás evaluaciones alcanzando un promedio de 0,970, mientras que la cepa BF4 alcanza un promedio de 0.503 de absorbancia. En la evaluación del crecimiento bajo exposición de aluminio se

destacaron las cepas BF9 y BF2 quienes alcanzaron los valores más altos de crecimiento medido en absorbancia con promedios de 1,31 y 1,26 respectivamente. Los aislamientos del cantón Buena Fe recuperados del cultivo de Maíz presentaron tolerancia a la exposición de Zinc mostrando rangos de crecimiento similares en cada uno de los aislamientos en un rango de absorbancia de 0,721 a 1,303 nm.

Se evidenció interferencia en el desarrollo celular propiciado por la exposición a mercurio, ocasionando reducción de hasta el 100% del crecimiento, mostrando coincidencias con los aislamientos del cantón La Mana y Quevedo. Las cepas que manifestaron tolerancia fueron BF7 y BF4, mismas que presentan reacción positiva (++) a la presencia de la enzima amilasa.

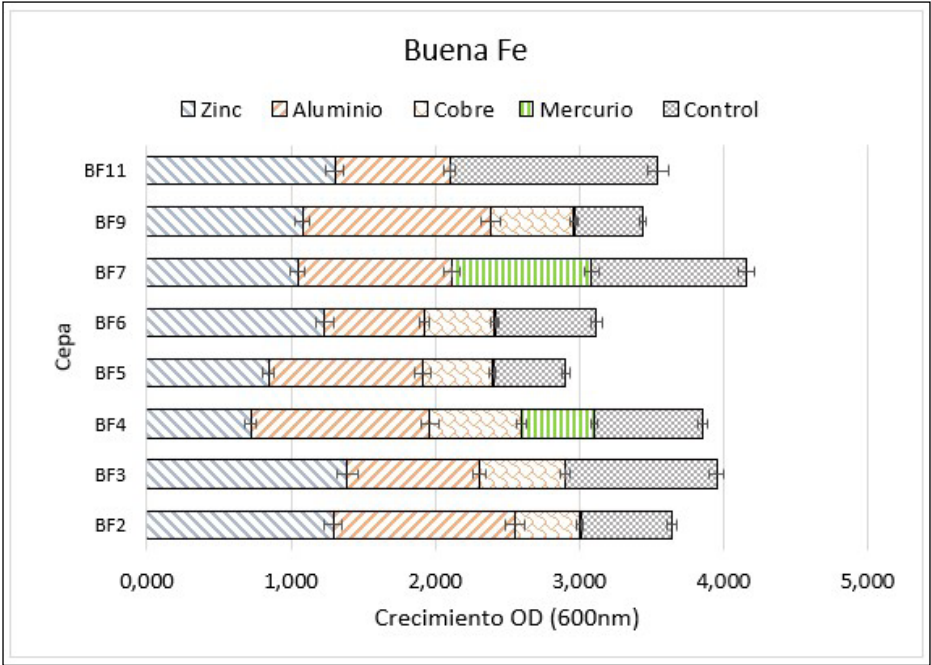


Figura 5. Crecimiento celular aislamientos bacterianos cantón Buena Fe en diferentes metales pesados (Zinc, Aluminio, Cobre y Mercurio). Las barras de error indican $\pm$ DE.

4.4. ANÁLISIS DE SUELO, DIFERENTES LOCALIDADES DE MUESTREO

El análisis de suelo reveló diferencias significativas en la presencia de metales pesados, obteniendo las concentraciones más altas de mercurio y cobre en el cantón La Mana, alcanzando un valor promedio de 0.8 ppm, mientras que para zinc y aluminio las concentraciones más altas se obtuvieron en el cantón Buena Fe y Quevedo en concentraciones de 3.6 ppm y 3 meq*100g⁻¹ respectivamente.

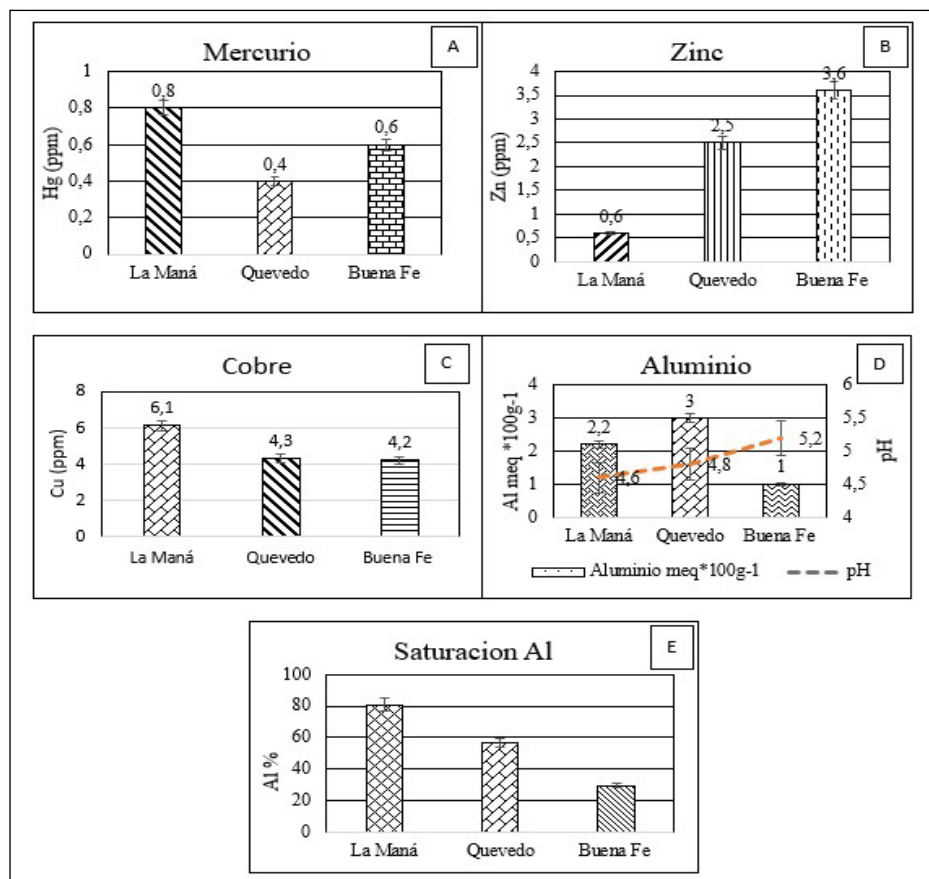


Figura 6. Concentración de Mercurio, Zinc, Cobre y Aluminio en diferentes zonas agrícolas de la provincia de Los Ríos. Las barras de error indican $\pm$ DE.

4.5. REDUCCIÓN DE METALES POR BIOSORCIÓN

Todas las cepas en estudio mostraron reducción en las concentraciones de los metales pesados, la máxima reducción de evidencia a las 72 horas de incubación. La cepa QV8 mostró resistencia a zinc, cobre y mercurio por lo que se sometió a las pruebas de biosorción en concentraciones de 35 ppm, 15 ppm y 18 ppm respectivamente, reduciendo más del 50% de la concentración inicial. La cepa FB7 mostro reducción de mercurio en concentración de 18 ppm a 0.35 ppm en suspensión.

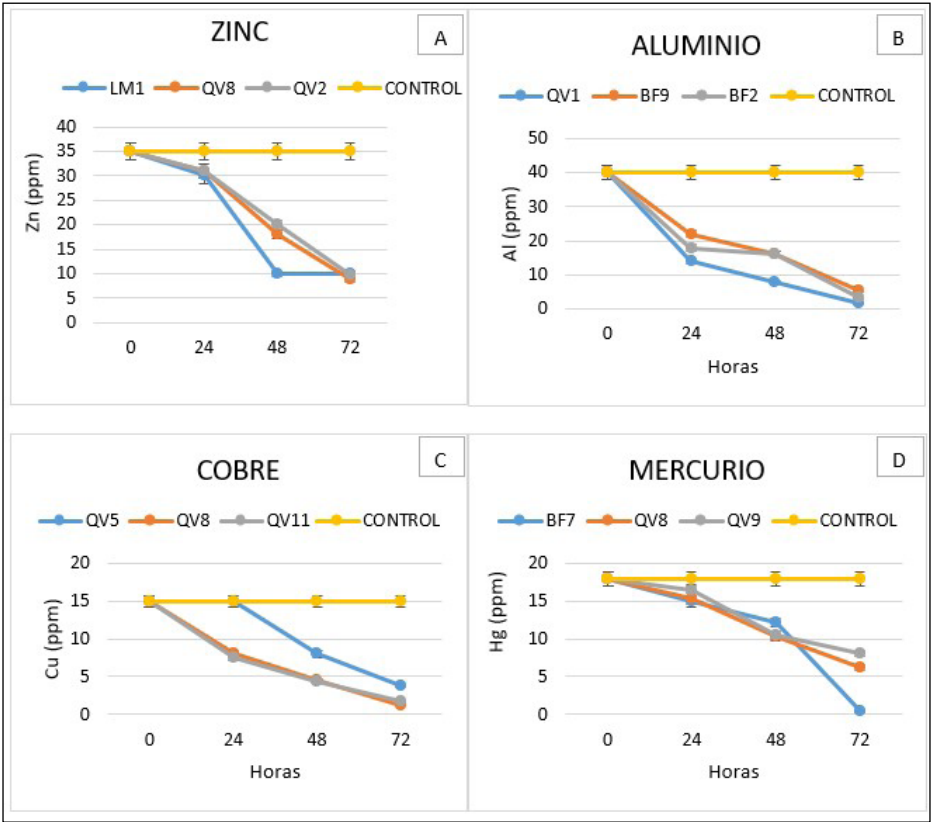


Figura7. Reducción por biosorción bacteriana de las concentraciones de Zinc (Figura 7A) Aluminio (Figura 7B) Cobre (Figura 7C) y Mercurio (Figura 7d); tiempo máximo de expiación 72 horas. Las barras de error indican ± DE.

4.6. PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIOLÓGICA POR ANTIBIOGRAMA

El 10% de las cepas mostraron baja susceptibilidad a tetraciclina, a excepción de BF9 quien reacciona con susceptibilidad media en exposición permanente. Para los antibióticos de amplio espectro con base de penicilina y ampicilina la población evaluada mostró un 80% de reducción en el crecimiento celular, mientras que la cepa QV8 mostró alta susceptibilidad ante la exposición de ambos antibióticos. En los rangos de inhibición producidos por cloranfenicol se logró obtener un 70% de susceptibilidad en la población evaluada, las cepas QV8, QV11 y BF2 no presentaron disminución en el crecimiento ni formación de halos de inhibición.

Tabla 5. Antibiograma químico

CEPA	CLORANFENICOL	AMPICILINA	PENICILINA	TETRACICLINA
LM1	++	-	-	-
QV1	+	-	+	-
QV2	++	++	+	-
QV5	+	+	-	-
QV8	-	++	++	-
QV9	++	++	+	-
QV11	-	+	+	-
BF2	-	++	++	-
BF7	+	+	+	-
BF9	++	+	+	+
% SUCEP	70%	80%	80%	10%

++: Alta susceptibilidad +: susceptibilidad media -: No presenta susceptibilidad

En la figura 8 se evidencia halos de inhibición producidos por la exposición directa de antibióticos compuestos por tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina y penicilina. Cada grupo bacteriológico presenta características de antibiograma definidas que difieren en cada cepa evaluada, las mayores susceptibilidades se evidenciaron en la exposición permanente de ampicilina y penicilina por su acción de amplio espectro, capaz de penetrar bacterias Gram

positivas, algunas Gram negativas y aerobias, interfiriendo con la síntesis de la pared celular durante la replicación citológica. La cepa LM1 presento resistencia a gran parte de los antibióticos de acción bacteriostática incluidos (Ampicilina, penicilina y tetraciclina).

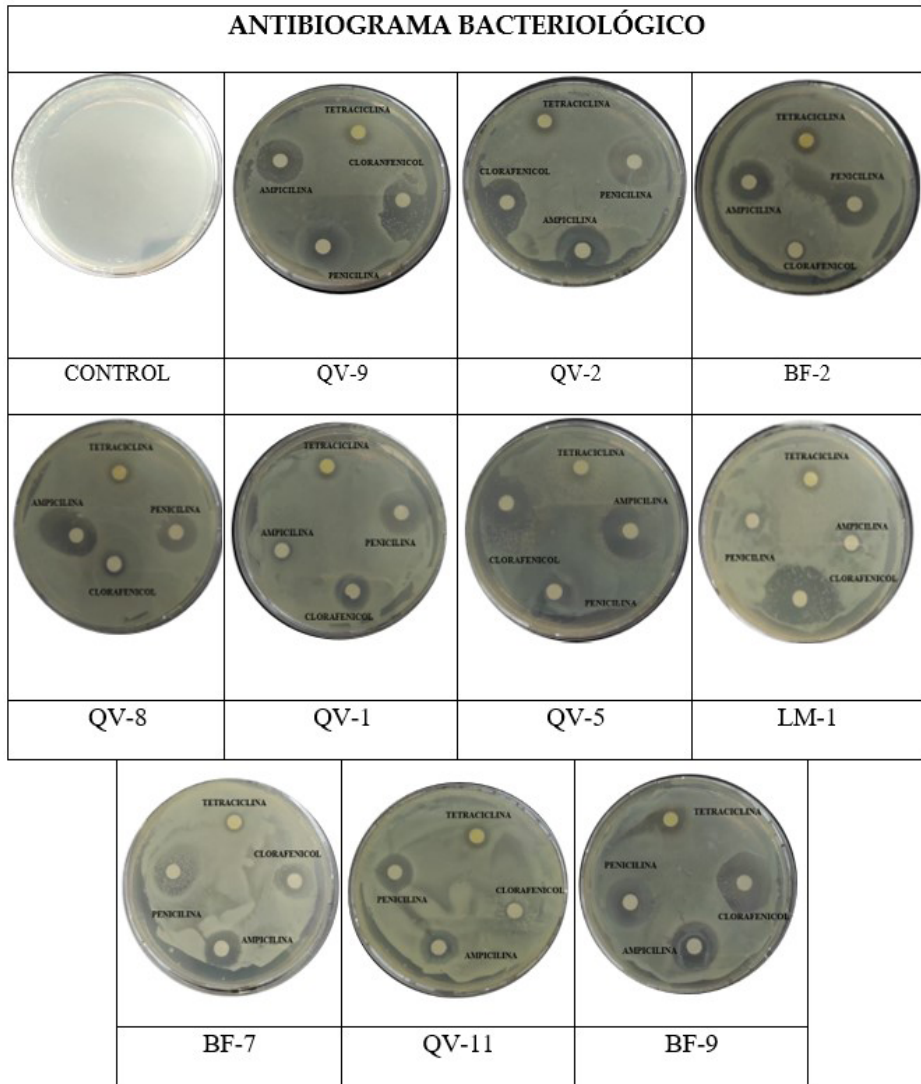


Figura 8. Inhibición de crecimiento radial en diferentes antibióticos comerciales

4.7. CONFRONTACIÓN PLANTA-BACTERIA- METAL PESADO

Basados en la preselección de rasgo de identificación bioquímica y resistencia a metales por parte de las bacterias. Los resultados demuestran que las bacterias ejercen un efecto estimulante en plántulas de arroz al estar sometidas a mercurio, aluminio, zinc y cobre a una concentración de; HgCl_2 18 ppm; ZnSO_4 35 ppm; Cu 15 ppm; y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)$ 40 ppm. La variable del peso foliar fue estadísticamente igual en todos los tratamientos a excepción del control sin bacteria (CT) y el testigo absoluto (CTSM) en los tratamientos de mercurio y zinc que se evidencio disminución del peso foliar. El mayor volumen radicular se evidencio en las cepas BF7, QV8, QV9, BF9, QV2, existiendo significancia estadística en los distintos metales pesados mencionados con promedios de 5,5 a 7,5 cm³ superando control sin bacteria (CT) y el testigo absoluto (CTSM).

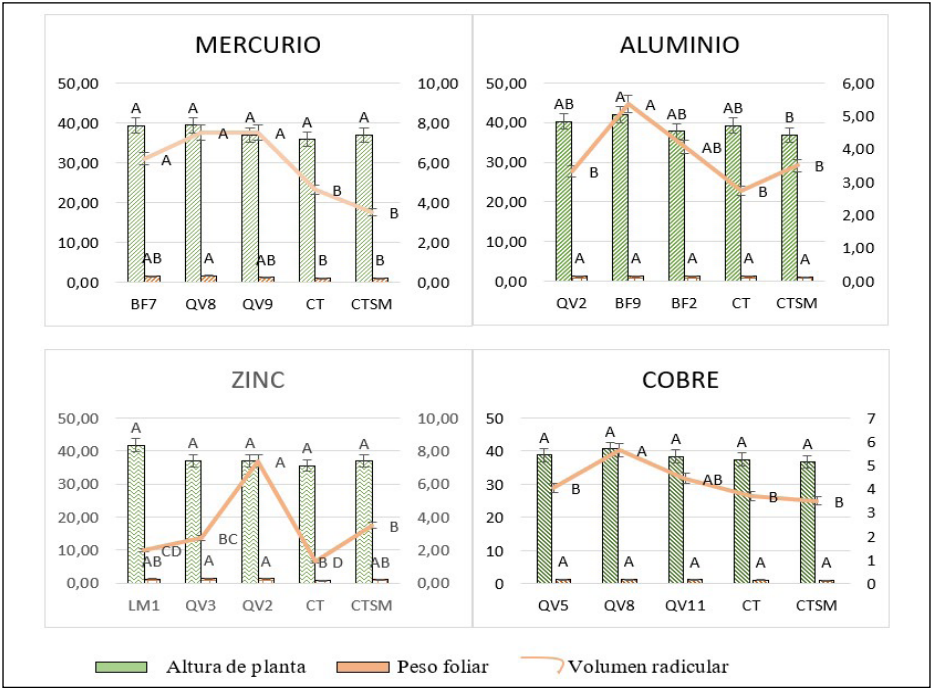


Figura 9. Aluminio, Zinc y Cobre. Las barras de error indican $\pm$ DE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0,05$ (test de Tukey).

En la figura 10 se consigue manifestar la reducción de crecimiento en plántulas de arroz sin inoculación bacteriana + (Metal pesado) dichos tratamientos exhiben inhibición de raíces secundaria y áreas necróticas en el sistema foliar debido a la acumulación de metales pesados. El tratamiento de Aluminio sin inoculación generó plantas más débiles y con aparente etiolación mientras que las plantas inoculadas del mismo tratamiento no presentaron reducción en el crecimiento. El zinc generó reducción radicular y hojas estrechas en plantas sin inoculación mientras que los tratamientos bacterianos presentaron un sistema radicular fuerte. Los tratamientos de cobre y mercurio sin inoculación bacteriana también exhibieron reducción en el crecimiento y desarrollo de masa foliar.

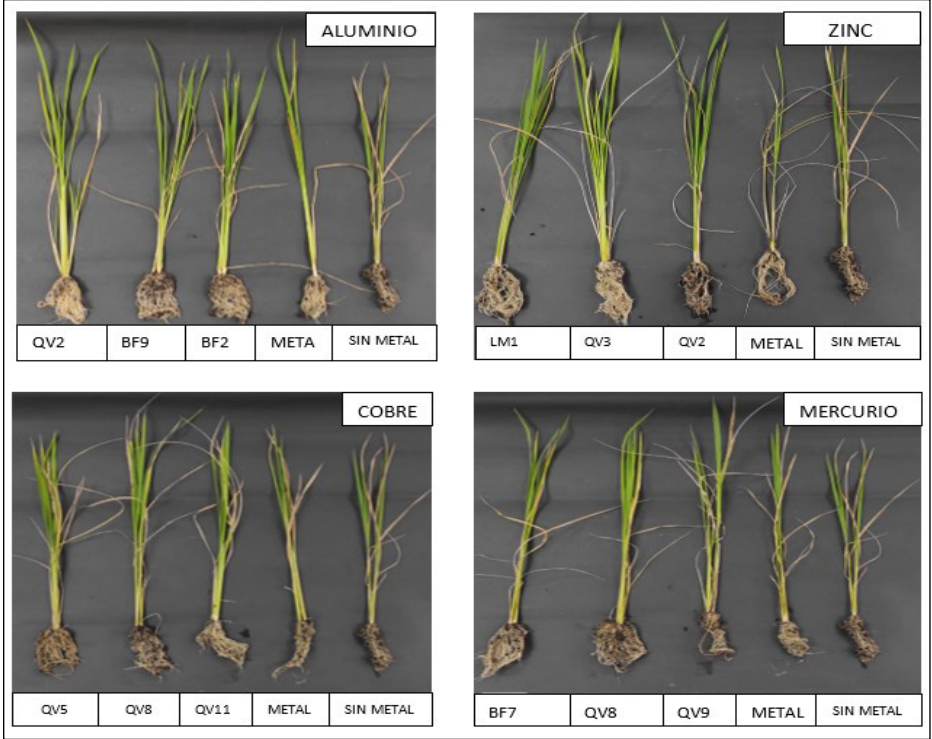


Figura 10. Efectos en la morfología de *Oryza sativa* ante la inoculación de bacterias bioprecipitadoras de Aluminio, Zinc, Cobre y Mercurio. Filas posteriores 1-3 tratamientos bacterianos fila 4 sin inoculación bacteriana + metal y fila 5 sin metal.

4.8. DISCUSIÓN

En el estudio de los caracteres morfológicos y bioquímicos se logró determinar la presencia de bacterias Gram negativas quienes presentaron los valores más altos de crecimiento celular al ser expuesta a los metales pesados en estudio, datos que coinciden con la investigación propuesta por Solano (2021), quien destaca la obtención de 9 cepas del aislamiento de distintos sitios, obteniéndose 5 y 4 cepas de cada lugar, respectivamente. De estas 9 cepas, 4 de las 5 provenientes de la mina el Bote resultaron ser Gram positivas, al igual que 3 de las 4 cepas provenientes de la unidad deportiva de Concepción del Oro, resultando en total 7 cepas Gram positivas y dos Gram negativas. De las 9, 8 tuvieron morfología de cocos. Dichas características están sujetas a cambio debido a la diversidad bacteriana en los sitios de recolección regulada por diversos factores bióticos y abióticos de cada hábitat que favorecen su establecimiento y crecimiento; por lo cual es favorecida en suelo y rizosfera por la disposición de nutrientes (Yu *et al.*, 2017).

La biosorción de metales por bacterias ha recibido una atención significativa debido a una seguridad, productiva, y tecnología viable para el tratamiento de suelos y aguas residuales que contienen metales pesados. Estas bacterias que toleran metales pueden unir los metales pesados tóxicos catiónicos con las estructuras bacterianas cargadas negativamente y los componentes de la biomasa vivos o muertos (Priyadarshane y Das, 2021).

Los géneros de *Bacillus* y *Pseudomonas* en suelo y rizosfera, se adaptan más fácilmente a los cambios de temperatura, pH y desecación entre otros, y la selección de resistencia a sustancias tóxicas que les permiten sobrevivir en sitios contaminados con metales, los cuales representan un sitio hostil para su crecimiento (Santana *et al.*, 2020).

En estudios previos llevados a cabo por Quispe y Coral en el (2018) para determinar los tiempos de reducción de las concentraciones de Pb+2 se obtuvo una remediación promedio de 90.6 % a los 5 días, 93.7 % a los 15 días y 94.7 % a los 35 días de incubación, con un tiempo de vida de la bacteria de 12 días luego de la incubación. Concluyendo que las condiciones óptimas se obtuvieron a los 35 días de incubación con un porcentaje de remediación de Pb+2 del 94.7 %,

discriminando estadísticamente las unidades formadoras de colonias. Así como también se observó que el comportamiento cinético va de acuerdo con la isoterma de Freundlich. Bacterias pertenecientes a dos géneros Gram-negativos *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*) y *Azotobacter* (*A. chroococcum*) y un género Gram-positivo *Bacillus* (*B. subtilis*) demuestran una eficacia excepcional en la eliminación de metales y, por lo tanto, proporciona una comprensión completa del proceso de sorción de bacterias y metales que, de hecho, allana el camino para la desintoxicación / eliminación de metales del entorno contaminado (Rizvi *et al.*, 2020).

Pérea *et al.*, (2018) evidencia que 13 cepas bacterianas con tolerancia a concentraciones tóxicas de Pb^{2+} y Zn^{2+} , se inocularon en raíces de plántulas de *A. thaliana* crecidas en presencia de 100 μM de Pb^{2+} . 6 aislados bacterianos causaron un efecto de mayor desarrollo en la parte aérea como en la raíz principal de la planta, en comparación con las plántulas no inoculadas. El efecto promotor del crecimiento en la planta puede deberse en parte a la síntesis por la bacteria de ácido indolacético o sideróforos, característica que ya ha sido bien documentada en otros ejemplos de bacterias.

Saranya *et al.*, (2018) sugiere en su estudio que bacterias del genero *Cronobacter* puede eliminar de manera eficiente los metales pesados y estas bacterias podrían usarse para la eliminación de metales de los suelos agrícolas. Mientras que Rahman *et al.*, (2019). Afirma que el mecanismo subyacente para la biosorción es la unión de los iones metálicos a través de grupos funcionales en la superficie de la biomasa. En conclusión, se demuestra un biotratamiento efectivo de Pb y Cd a partir de medio acuoso utilizando un biosorbente de bajo costo preparado a partir de Cepa AMB-2 de *Staphylococcus hominis* considerando la bioseguridad de los microorganismos y un enfoque ecológico.

Sahmoune, (2018) demuestra con estudios termodinámicos la naturaleza espontánea y exotérmica de los procesos de sorción determinando la presencia de ácidos diluidos (HCl y H_2SO_4) quienes son bastante efectivos en la desorción de metales pesados. El intercambio de iones jugó el papel principal en el mecanismo de adsorción del metal, y los grupos carboxilo están involucrados principalmente en este mecanismo. Así mismo Fathollahi *et al.*, (2021)

destacan que Las altas temperaturas ($> 35^{\circ}\text{C}$) redujeron las eficiencias de eliminación de Cu (II) y Zn (II) y aumentaron las eficiencias de los iones Cd (II) y Cr (III). La máxima eficiencia de biosorción de metales pesados no esenciales se produjo con tiempos de contacto cortos (< 2 h). Los metales esenciales como Zn y Cu se eliminaron de manera más eficiente con duraciones largas de biosorción (> 24 h). La capacidad media de biosorción de la biomasa bacteriana estaba entre 71^{-1} .

Hasyimah *et al.*, (2021) demostraron que las células muertas tienen el potencial de un nuevo biosorbente. Para su futura aplicación, se optimizaron las condiciones de cultivo de la biomasa de las células QB1 utilizando la metodología de superficie de respuesta. Se encontró que la concentración óptima de peptona y sal marina era 0,91% y 3,39%, respectivamente, y el tiempo de incubación óptimo fue 29 h. Además, propusimos que el tratamiento ultravioleta es un método alternativo para preparar las células muertas. Estos resultados sugieren una nueva alternativa en el tratamiento de suelos y aguas contaminados con metales pesados mediante el crecimiento acelerado de células bacterianas que presentan cargas negativas simulando los coloides del suelo reteniendo fuertemente los metales pesados.

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La humanidad necesita hombres prácticos, que sacar el mayor provecho de su trabajo, y, sin olvidar el interés general, salvaguardar sus propios intereses. Pero la humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio. - *Marie Curie.*

51. CONCLUSIONES

El 35% de los aislamientos corresponde a bacterias Gram negativas quienes fueron capaces de reducir las concentraciones iniciales de Zn en un 50% transcurrida 72 horas de incubación en medio de cultivo líquido.

Se logró evidenciar la reducción de las concentraciones de Mercurio (Hg), Zinc (Zn), Aluminio (Al) y Cobre (Cu) trascurrido un periodo de incubación de 72 horas, cada tratamiento bacteriano mostro un elevado potencial en biorremediación en cortos periodos de exposición.

En el presente estudio se alcanzó reducir las concentraciones de mercurio iniciales de 18 ppm a 0.35 ppm en suspensiones liquidas mediante la acción de cepas bacterianas aisladas de la rizosfera del suelo agrícola.

El 80% de las bacterias en estudio de precipitación y reducción de metales pesados presentaron susceptibilidad a penicilina y ampicilina en el análisis de antibiograma mientras que solo un 10% fue susceptible a tetraciclina.

5.2. RECOMENDACIONES

Considerar las temperaturas de incubación para mejorar la eficiencia de biosorción precipitación de metales pesados modificando los intervalos de tiempo y midiendo los parámetros cada 12 horas.

Establecer técnicas moleculares, que permitan identificar las especies bacterianas por medio del gen del ARNr 16S basadas en secuencias nucleotídicas conservadas, y la amplificación de genes ligados a la resistencia de altas concentraciones de metales pesados.

Emplear diferentes plantas bio acumuladoras para los ensayos de resistencia con la finalidad de determinar los efectos adversos en las funciones fisiológicas y la adaptabilidad de las bacterias la rizosfera de los cultivares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, B., Solanki, B., Zaidi, A., Khan, M. S., & Musarrat, J. (2019). Bacterial toxicity of biomimetic green zinc oxide nanoantibiotic: insights into ZnONP uptake and nanocolloid–bacteria interface. *Toxicology research*, 8(2), 246-261.
- Aparicio Marenco, D. E., Duarte Amador, D. Y., & Baldiris Avila, R. (2018). *Microbiología*. Corporacion Universitaria Rafael NUñez.
- Ashraf, S., Ali, Q., Zahir, Z. A., Ashraf, S., & Asghar, H. N. (2019). Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 714-727.
- Callejas-Cañarte, G. V., Cisneros-Rojas, C. A., & Caicedo-Bejarano, L. D. (2018). Capacidad solubilizadora de fosfato de aluminio por hongos rizosféricos aislados de un Andisol colombiano. *Entramado*, 14(2), 218-227.
- Elzeini, H. M., Ali, A. A., Nasr, N. F., Awad, A. A., & Hassan, A. A. (2017). Morphological and rheological identification of cocci lactic acid bacteria. *J Microb Biochem Technol*, 9(01), 519-26.
- Fathollahi, A., Khasteganan, N., Coupe, S. J., & Newman, A. P. (2021). A meta-analysis of metal biosorption by suspended bacteria from three phyla. *Chemosphere*, 268, 129290.
- Fernández González, R. (2020). Eliminación de metales pesados mediante biosorción: desarrollo de procesos de tratamiento para aguas residuales industriales.
- Fomina Marina., & Geoffrey Michael Gadd. (2017), Biosorption: current perspectives on concept, definition and application, *Bioresource Technology*, Volume 160, Pages 3-14, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102>.
- Fuentes Barros, E. P. (2017). Recuperación de metales pesados por métodos físico-químicos en piscinas de lodos (cortes de perforación de pozos petroleros) en la empresa Plusambiente SA

(Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

González Beltrán, Y. A., Mejía Martínez, D. P., & Méndez Ariza, Y. M. (2018). Aprovechamiento de los residuos de madera.

Hasyimah, N. A. R., Furusawa, G., & Amirul, A. A. (2021). Biosorption of a dye and heavy metals using dead cells of filamentous bacterium, *Aureispira* sp. CCB-QB1. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(6), 1627-1636.

Janeta Londo, R. (2018). Evaluación de la *Pseudomonas* sp. En procesos de biorremediación en una celda de combustible microbiana con metales pesados sintéticos a efectuarse en el Centro de investigación de energías alternativas y ambiente de la ESPOCH, 2016 (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

Jara Medina, J. E. (2018). Desarrollo de una metodología de recuperación de suelos altamente contaminados con metales pesados utilizando remediación fisicoquímica y fitorremediación (Doctoral dissertation, Universidad Andrés Bello).

Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2017). Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Frontiers in microbiology*, 8, 2593.

King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44(2), 301-307.

Lehrich, B. M., Liang, Y., Khosravi, P., Federoff, H. J., & Fiandaca, M. S. (2018). Fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3538.

Loayza Céspedes, J. C. (2020). Degradación de la fertilidad química y biológica del suelo por efecto del cultivo intensivo de la papa en Potreropampa, Andahuaylas, Apurímac.

Marti Monfort, C. (2014). El nuevo régimen jurídico sobre suelos

contaminados a partir de la Ley 22/2011, de 28 de julio, sobre residuos y suelos contaminados.

- Martínez Sepúlveda, J. A., & Casallas, M. R. (2018). Contaminación y remediación de suelos en Colombia: aplicación a la minería de oro.
- Mateos González, P. F., Rubio Pérez, B., Martínez Molina, E., Tejedor Gil, C., Flores Félix, J. D., Celador Lera, L., & Velázquez Pérez, M. E. (2017). Implementación de una nueva práctica para el aprendizaje de la identificación mediante MALDI-TOF MS de microorganismos procariotas y eucariotas presentes en alimentos probióticos.
- Medrano Ortiz, K. I. (2018). Metales pesados en lodos residuales vertidos en socavones y revegetación en la mina de arena de San Miguel Tlaixpan, Texcoco (Master's thesis).
- Méheust, R., Burstein, D., Castelle, C. J., & Banfield, J. F. (2019). The distinction of CPR bacteria from other bacteria based on protein family content. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
- Mishra, S., Bharagava, R. N., More, N., Yadav, A., Zainith, S., Mani, S., & Chowdhary, P. (2019). Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. In *Environmental biotechnology: For sustainable future* (pp. 103-125). Springer, Singapore.
- Monge-Amaya, O., Valenzuela-García, J. L., Acedo-Félix, E., Certucha-Barragán, M. T., & AlmendÁRiz-Tapia, F. J. (2008). Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 24(3), 107-115.
- Morrone, J. J. (2000). El lenguaje de la cladística. UNAM, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial.
- Ole ska, E., Imperato, V., Małek, W., Włostowski, T., Wójcik, M., Swiecicka, I. y Thijs, S. (2020). Bacterias asociadas a *Trifolium repens* como herramienta potencial para facilitar la fitoestabilización de pilas de desechos contaminados con zinc y plomo. *Plantas*, 9 (8), 1002.

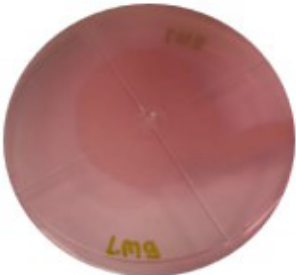
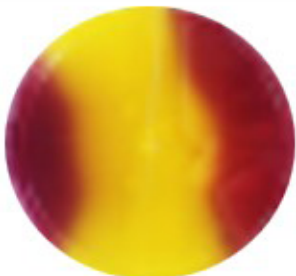
- Pérea-de Ávila, D., Sánchez-Calderón, L., & Balderas-Hernández, V. E. (2018). Aislamiento Y Caracterización De Microorganismos Con Características De Promoción En La Absorción De Metales Pesados En El Estado De Zacatecas. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 2(1).
- Pérez, A., Martínez, D., Barraza, Z., & Marrugo, J. (2016). Bacterias endófitas asociadas a los géneros *Cyperus* y *Paspalum* en suelos contaminados con mercurio.
- Perez, M. P. T. (2019). Biorremediación de mercurio y níquel por bacterias endófitas de macrófitas acuáticas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 36-44.
- Poeplau, C., Vos, C., & Don, A. (2017). Soil organic carbon stocks are systematically overestimated by misuse of the parameters bulk density and rock fragment content. *Soil*, 3(1), 61-66.
- Priyadarshane, M., & Das, S. (2021). Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104686.
- Quiroga Velasco, M. (2018). Evaluación de la Biosorción de Cobre (Cu) mediante adsorbentes bacterianos provenientes del Canal los Ángeles de la ciudad de Bogotá.
- Quispe Velez, G. S., & Coral Peralta, K. (2018). Biosorción de Pb+ 2 por la bacteria *pseudomona aeruginosa* en suelo contaminado por minerales.
- Rahman, Z., Thomas, L., & Singh, V. P. (2019). Biosorption of heavy metals by a lead (Pb) resistant bacterium, *Staphylococcus hominis* strain AMB-2. *Journal of basic microbiology*, 59(5), 477-486.
- Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K. H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International*, 125, 365-385.

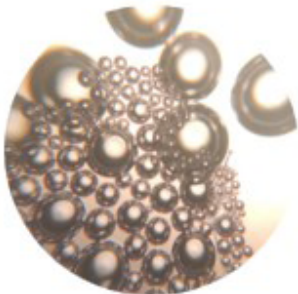
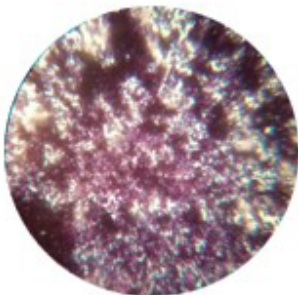
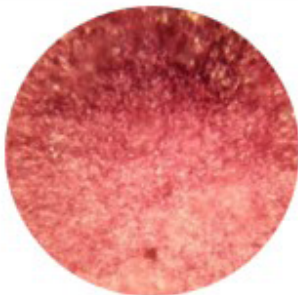
- Rizvi, A., Ahmed, B., Zaidi, A., & Khan, M. S. (2020). Biosorption of heavy metals by dry biomass of metal tolerant bacterial biosorbents: an efficient metal clean-up strategy. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(12), 1-21.
- Rodríguez Acosta, J. L. (2018). Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* "in vitro" (Bachelor's thesis, Quevedo-UTEQ).
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166-167.
- Sahmoune, M. N. (2018). Performance of *Streptomyces rimosus* biomass in biosorption of heavy metals from aqueous solutions. *Microchemical Journal*, 141, 87-95.
- Santana-Flores, A., Sánchez-Ayala, A., Romero-Ramírez, Y., Toledo-Hernández, E., Ortega-Acosta, S. Á., & Toribio-Jiménez, J. (2020). Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados, obtenidas de los jales mineros El Fraile, México. *Terra Latinoamericana*, 38(1), 67-75.
- Saranya, K., Sundaramanickam, A., Shekhar, S., Meena, M., Sathishkumar, R. S., & Balasubramanian, T. (2018). Biosorption of multi-heavy metals by coral associated phosphate solubilising bacteria *Cronobacter muytjensii* KSCAS2. *Journal of environmental management*, 222, 396-401.
- Schnellbaecher, A., Binder, D., Bellmaine, S., & Zimmer, A. (2019). Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies. *Biotechnology and bioengineering*, 116(6), 1537-1555.
- Singh, N., Singh, J., & Singh, K. (2018). Small at size, big at impact: microorganisms for sustainable development. In *Microbial bioprospecting for sustainable development* (pp. 3-28). Springer, Singapore.
- Smitha, M. S., Singh, S., & Singh, R. (2017). Microbial biotransformation: a process for chemical alterations. *J Bacteriol Mycol Open Access*, 4(2), 85.

- Solano Elías, F. (2021). Análisis del comportamiento ante metales pesados en bacterias aisladas de relaves mineros zacatecanos.
- Tondin, B. R., Wink, P. L., Sanches, P. R. S., Susin, A. A., Silva Junior, D. P. D., Muller, A. F., ... & Barth, A. L. (2018). Desenvolvimento de um dispositivo automatizado para leitura do teste de suscetibilidade (Antibiograma) por disco-difusão de bactérias de importância clínica. *Clinical and biomedical research*. Porto Alegre.
- Velasco Trejo, J. A. (2017). Estudio de los mecanismos de degradación de ddt y sus intermediarios en suelos contaminados mediante labio estimulación de poblaciones microbianas para proponer estrategias de remediación.
- Wang, S., Qiu, L., Liu, X., Xu, G., Siegert, M., Lu, Q., & Qiu, R. (2018). Electron transport chains in organohalide-respiring bacteria and bioremediation implications. *Biotechnology advances*, 36(4), 1194-1206.
- Wei, Y., Zhao, Y., Zhao, X., Gao, X., Zheng, Y., Zuo, H., & Wei, Z. (2020). Roles of different humin and heavy-metal resistant bacteria from composting on heavy metal removal. *Bioresource Technology*, 296, 122375.
- Xie, X., Fu, J., Wang, H., & Liu, J. (2018). Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China. *African Journal of Biotechnology*, 9(26), 4056-4066.
- Yu, X., Y. Li, C. Zhang, H. Liu, J. Liu., W. Zheng, X. Kang, X. Leng, K. Zhao, Y. Gu, X. Zhang, Q. Xiang, and Q. Chen. 2017. Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. *Plos One* 9: e106618. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106618>.
- Yuvaraj, M., & Mahendran, P. P. (2020). Soil Pollution Causes and Mitigation Measures. *Biotica Research Today*, 2(7), 550-552.
- Zuluaga-Cabrera, A. M., & Martínez-Aranzaes, J. R. (2018). Diagnóstico de *Helicobacter* spp. en mucosa gástrica de equinos, mediante pruebas de actividad ureasa. *Revista Científica*, 28(1).

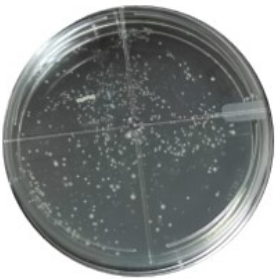
ANEXOS

ANEXO 1. Pruebas bioquímicas

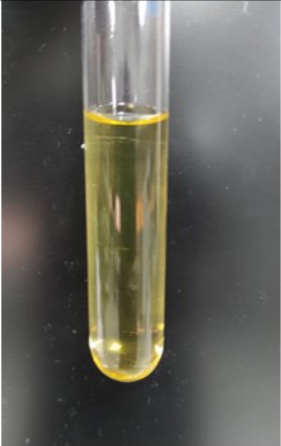
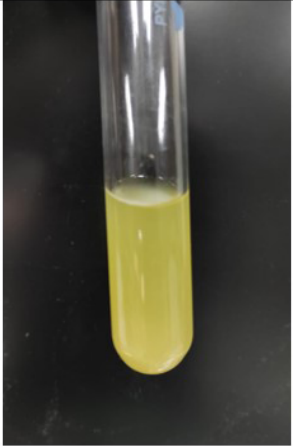
UREASA	
Reacción positiva	Reacción negativa
	
FLUORESCENCIA	
Reacción positiva	Reacción negativa
	
SOLUBILIZACIÓN DE POTASIO	
Reacción positiva	Reacción negativa
	

FOSFATASA	
Reacción positiva	Reacción negativa
	
CATALASA	
Reacción positiva	Reacción negativa
	
Tinción Gram	
Positiva	Negativa
	

ANEXO 2. Crecimiento celular en aislamientos

AISLAMIENTO DE CEPAS DEL SUELO		
Quevedo	Buena fe	La Maná
		

ANEXO 3. Transformación de crecimiento celular a biomasa bacteriana

BIOSORCIÓN Y BIOPRECIPITACIÓN		
Testigo sin inoculante 72 horas	Testigo son metal 72 horas	Tratamiento precipitado 72 horas
		

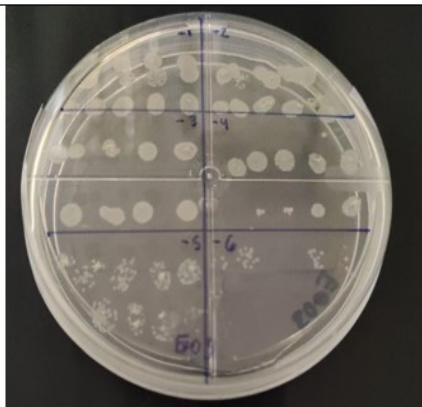
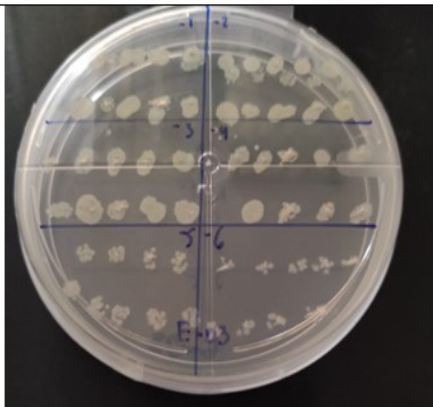
ANEXO 4. Cultivo de *Oryza sativa* sometido a tratamientos bacterianos

Tratamiento de reducción de metales pesados en plántulas de arroz

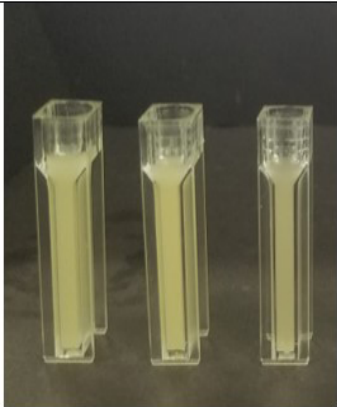


ANEXO 5. Concentración celular UFC por mL

Cuantificación de UFC



ANEXO 6. Muestras para análisis de espectrofotometría

Espectrofotometría	
	

ANEXO 7. Purificación de cepas

Procesamiento microbiológico	
	



Dr. EDUARDO DÍAZ OCAMPO, Ph.D.
RECTOR

Ing. YENNY GUISELLI TORRES NAVARRETE, Ph.D.
VICERRECTORA ACADÉMICA

Ing. BOLÍVAR ROBERTO PICO SALTOS, M.Sc.
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

Econ. CARLOS EDISON ZAMBRANO, Ph.D.
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN - DICYT

ISBN: 978-9978-371-41-1



9 789978 371411

