

BACTERIAS BIOTRANSFORMADORAS DE HIDROCARBUROS Y METALES PESADOS

Biotecnología ambiental



*Joselyn Vilela Sabando
Fernando Abasolo Pacheco*

BACTERIAS BIOTRANSFORMADORAS DE HIDROCARBUROS Y METALES PESADOS - BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

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: Vilela J. y Abasolo F. 2022. Bacterias biotransformadoras
de hidrocarburos y metales pesados - Biotecnología
Ambiental. Universidad Técnica Estatal de Quevedo,
Ecuador. 92 pp.

Revisión de Pares Externos: Manuel Carrillo Zenteno
Doctor em Solos e Nutricao de Plantas
Estación Experimental Tropical Pichilingue - INIAP
Tito Bohorquez Barros
Magister en Administración de Empresas
Universidad Técnica de Babahoyo

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

Primera Edición: Quevedo, Agosto del 2022.

ISBN: 978-9978-371-35-0



UTEQ
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE
QUEVEDO



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 distinguen por su innovación, metodología, rigor técnico o impacto social.

La tesis presentada en opción al grado de Magister Gestión Ambiental de la Ing. Joselyn Vilela Sabando, 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.



BACTERIAS BIOTRANSFORMADORAS DE HIDROCARBUROS Y METALES PESADOS

Biotecnología ambiental

AUTORES:

Joselyn Roxanna Vilela Sabando
Fernando Abasolo Pacheco



PREFACIO

La presente investigación titulada “Bacterias biotransformadoras de hidrocarburos y metales pesados, aisladas de suelos contaminados de la provincia Sucumbíos, Ecuador” representa el esfuerzo y dedicación de los autores. Han plasmado el creciente problema de contaminación de suelos por la incorporación de diversos contaminantes, como los hidrocarburos y los metales pesados, así como las alternativas de biorremediación de suelos, a partir del uso de microorganismos, particularmente de bacterias autóctonas de suelos contaminados en la Amazonia Ecuatoriana. Para la selección de estos potenciales biorremediadores, se hace una caracterización de las cepas, estudiando su funcionalidad y capacidad de degradación, transformación y asimilación de contaminantes orgánicos e inorgánicos.

El objetivo de esta investigación es identificar el potencial de las cepas bacterianas en la optimización de procesos de biorremediación que permitan eliminar de una forma segura y sustentable la contaminación producida por hidrocarburos y metales pesados. Dicho potencial está dado por las características fisiológicas, ecológicas y bioquímicas de las cepas seleccionadas, por ejemplo, adaptabilidad a los ambientes contaminados, resistencia y formación de consorcios bacterianos.

Se presenta información relevante sobre cepas bacterianas autóctonas de suelos de la Amazonía Ecuatoriana con beneficio ambiental, que podrían mejorar las condiciones físicas, químicas y biológicas de los suelos contaminados. Los resultados obtenidos sitúan a esta investigación como una importante contribución en el área de biorremediación de suelos.

Tabla de contenido

PREFACIO.....VI

INTRODUCCIÓN.....01

CAPÍTULO I.....XVI

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.....XVI

CAPÍTULO II.....5

MARCO TEÓRICO5

CAPÍTULO III.....23

METODOLOGÍA.....23

3.2.1 POBLACIÓN Y MUESTRA.....25

CAPÍTULO IV.....34

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....34

CAPÍTULO V.....55

CONCLUSIONES.....55

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....57

INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo es uno de los temas de mayor atención y debate de la ciencia, pero también del mundo social y económico, puesto que consecuentemente se ve amenazada la seguridad alimentaria y la salud humana. Al suelo pueden adicionarse una variada gama de sustancias contaminantes, orgánicas e inorgánicas, provenientes de fuentes muy diversas (Jiménez, 2017). Con base en evidencia científica, la contaminación del suelo se ha dado en diferentes grados y por distintos contaminantes, siendo las actividades antrópicas las que mayormente han contribuido (Zhu et al., 2019). Muchos contaminantes que se incorporan al suelo son transportados por escorrentías de las aguas superficiales e infiltración a las subterráneas, lo que ocasiona daños ambientales a través de la bioacumulación y biomagnificación de contaminantes tóxicos y persistentes a lo largo de la cadena trófica. Esto acarrea problemas como la pérdida de biodiversidad, disminución de materia orgánica en suelos por el daño a microorganismos y afectaciones directas a la salud humana por el consumo de agua, cultivos y especies contaminadas (Rodríguez et al., 2019).

Los hidrocarburos son contaminantes orgánicos persistentes que tienen efectos similares a los contaminantes inorgánicos como por ejemplo el cadmio, los cuales pueden causar daños extensos y permanentes a los ecosistemas debido a su biomagnificación. Muchos métodos convencionales de descontaminación físico-química de suelos basados en ingeniería, son costosos debido a procesos de excavación y transporte de grandes cantidades de materiales contaminados para el tratamiento ex situ.

Los costos crecientes y la eficiencia limitada de estos tratamientos físico-químicos tradicionales han estimulado el desarrollo de tecnologías alternativas para aplicaciones in situ, particularmente basadas en la remediación biológica, aprovechando las capacidades de las plantas para bioacumular y de los microorganismos para absorber, transformar o degradar contaminantes en el suelo (Varjani, 2017).

Los organismos que se presentan comúnmente en el suelo cumplen funciones diferenciadas de acuerdo a su naturaleza, siendo este el caso de las bacterias. Desde la última década del siglo XX, se identificó que los microorganismos pueden degradar contaminantes orgánicos como los hidrocarburos (Barreto y Reyna, 2020) por su alta diversidad y capacidad de adaptación metabólica, que les confiere distintos mecanismos de acción sobre los contaminantes (Rodríguez, 2003 como se citó en Ordoñez et al., 2018). Los microorganismos del suelo también se usan directamente para transformar componentes tóxicos en formas benignas (FAO, 2021). Muchas bacterias pueden transformar diferentes contaminantes como los hidrocarburos saturados y aromáticos (Ramadass et al., 2018; Feng et al., 2021). Se conoce que las bacterias resistentes a metales pesados como el cadmio son de interés debido a su uso potencial en la biorremediación, de ahí la necesidad de comprender las estrategias de supervivencia y adaptación bajo estrés por metales (Zeng et al., 2019; Hemmat et al., 2018).

La biorremediación y sus diversas tecnologías conducen a la degradación de un contaminante objetivo, a un estado inofensivo o a niveles menores a los límites de permisibilidad establecidos por las normas o autoridades regulatorias. La acción microbiana como biorremediadores se fundamenta en la utilización de los contaminantes como fuente de energía, por parte de los microorganismos (Otero et al., 2021). La recuperación de un ambiente contaminado por medio de procesos de biotransformación y degradación de los contaminantes, exige un adecuado estudio y caracterización puesto que las bacterias que cumplen con la funcionalidad, en un principio, están presentes en el suelo contaminado en cantidades mínimas, pero que a través de nutrientes y condiciones físico-químicas apropiadas, estos organismos pueden llegar a reproducirse en grandes cantidades (Vizuite et al., 2020).

Mediante esta investigación se aislaron y caracterizaron bacterias nativas, con potencial para biotransformar hidrocarburos y metales pesados, que fueron seleccionadas por su respuesta positiva ante pruebas bioquímicas. Además, se determinaron interacciones entre los microorganismos para la posible formación de

consorcios microbianos.

Mediante esta investigación se aislaron y caracterizaron bacterias nativas, con potencial para biotransformar hidrocarburos y metales pesados, que fueron seleccionadas por su respuesta positiva ante pruebas bioquímicas. Además, se determinaron interacciones entre los microorganismos para la posible formación de consorcios microbianos.

CAPÍTULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

El secreto para seguir adelante es iniciar

Mark Twain

1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

El objetivo de la obra es dar a conocer los resultados obtenidos en un proyecto de investigación sobre el uso y manejo de bacterias con potencial de biorremediación cuyos objetivos se basaron en el aislamiento, caracterización y purificación de bacterias a partir de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados, en la zona de Sucumbíos, Ecuador. Además, de la selección de cepas bacterianas con capacidad para biotransformar diésel y cadmio, mediante bioensayos in vitro. Finalmente, la determinación in vitro de interacciones entre los microorganismos seleccionados para establecer consorcios microbianos.

Las muestras compuestas de suelos contaminados fueron extraídas del cantón Lago Agrio, provincia Sucumbíos, ubicada al nororiente de Ecuador. Esta es una zona considerada de importancia por su producción de petróleo; cuenta con una superficie de 3.128 km², una temperatura que va desde 20 a 31 °C. Presenta una variación considerable de lluvia mensual por estación, llegando a tener una precipitación media anual que va desde 71 mm hasta 133 mm y una altura de 300 msnm.

Hace más de 50 años se dio inicio a la explotación petrolera en la provincia Sucumbíos, constituyendo de esta forma la degradación de un suelo empobrecido y contaminado. El suelo de la provincia es un suelo carente en nutrientes, además presenta una serie de condicionantes y limitantes para la práctica agrícola. Sin embargo, en lugares poco poblados se presenta una extensión mínima de agricultura. Factores condicionantes como la transformación del clima, la reducción del nivel de precipitaciones y la modificación de las propiedades del suelo son algunos de las limitantes que podrían estar relacionadas.

1.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA

En la actualidad la contaminación de suelos por hidrocarburos y metales pesados acarrea una creciente preocupación que gira entorno al desarrollo de todas las actividades relacionadas al ser humano. En Ecuador se encuentran presentes los desechos

peligrosos o contaminantes en el suelo debido a los usos constantes, acompañados de una gestión poco adecuada entorno a las actividades extractivas y productivos. Se obvia la aplicación de normas y técnicas que regulen el manejo de las actividades, y que además tienden a disminuir el riesgo de la incorporación de contaminantes por accidentes. Es así que ha surgido la preocupación por aplicar tratamientos que permitan la remediación, remoción o mejora del recurso afectado.

Constantemente, se debe mantener la búsqueda de soluciones que permitan contrarrestar los graves efectos acarreados por la contaminación del suelo y agua, en el desarrollo de actividades relacionadas con compuestos tóxicos y peligrosos. Se han probado métodos convencionales de remoción en lugares contaminados, sin embargo, estos pueden causar un mayor impacto ecológico, por su toxicidad, poca efectividad, complejidad, costos y dificultad de degradación.

1.3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias están siendo utilizadas como alternativa que permite mitigar el impacto que se produce en la contaminación por hidrocarburos y metales pesados. En la creciente necesidad de generar nuevos tratamientos que permitan la remoción del contaminante, de forma eficiente y con un tiempo establecido, la biotecnología emergente aprovecha la capacidad metabólica de bacterias para degradar, bio-transformar, o generar subproductos poco nocivos, para el recurso afectado y toda la vida que sustenta; siendo un proceso en pocas palabras natural con baja afectación.

En la actualidad, a pesar de que se conoce la eficiencia de microorganismos para la producción de medicamentos y

degradación de contaminantes, se ha explorado menos del 1% de los microbios existentes según Manzi y Mayz (2003) y Morales et al. (2010). Para entender la presencia, crecimiento y acción de los microorganismos se reconoce la importancia de su estudio, puesto que la necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, su funcionalidad y beneficios. Esta limitante es consecuencia de que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales (Ruiz y Rodarte, 2003; Escalante, 2007; Beldarraín et al., 2017) ya que ciertos microorganismos dependen de las actividades de otros y de sus condiciones de cultivo.

En el caso de las bacterias como degradadoras y biotransformadoras de contaminantes, su actividad y efectividad dependerá exclusivamente de la formación de ambientes, condiciones, manipulación e implementación de técnicas de biorremediación. Por ello, es necesario identificar y caracterizar microorganismos con capacidad biorremediadora, además de establecer mediante evaluación y análisis, los posibles consorcios que favorezcan su acción en recursos contaminados. Estos son aspectos importantes a considerar para el desarrollo de esta investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Los obstáculos son las cosas espeluznantes que ves cuando pierdes de vista tu objetivo.

Henry Ford

2.1 FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL

2.1.3 Microorganismos

Los microorganismos desempeñan un papel vital en la transformación de elementos contaminantes altamente nocivos, incluidos los metales. Principalmente influyen su biodisponibilidad y remoción, alterando la toxicidad, solubilidad y movilidad del contaminante.

Dentro del grupo de microorganismos que han sido aislados por su potencial acción en procesos de remoción de contaminantes encontramos: *Xanthofacter*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycrobacterium*, *Nitrosomonas*, *Enterobacter* (Beltrán y Gómez, 2016).

2.1.4 Bacteria

Son organismos unicelulares del grupo de los procariontes, es decir que no poseen un núcleo celular y orgánulos como las mitocondrias, del aparato de Golgi o cloroplastos debido a esto el material genético encontrándose en el citoplasma totalmente libre; a pesar de la organización celular simple, presentan una gran variedad de formas como: vibrios, filamentos, cocos, bacilos y espirilos (Sánchez et al., 2017).

2.1.5.1 Función

Las bacterias son capaces de degradar, transformar o acumular, de forma natural, un amplio rango de compuestos, estos microorganismos, pueden asociarse para formar consorcios que degradan los compuestos (Butrón, 2020).

2.1.5.2 Tamaño

Las bacterias pueden medir entre 0.5 y 5 μ de longitud, siendo tan pequeñas que imposibilita verlas a simple vista, excepto cuando se agrupan en colonias (Sánchez et al., 2017).

Las colonias son la manera macroscópica, permitiendo la observación morfológica que constituye una agrupación de bacterias, encontradas en agrupaciones constituidas por la reproducción bacteriana, incubadas en un medio por un espacio de 24 h, ciertas bacterias requieren varias semanas de incubación, lo que permite su crecimiento y estar formadas por millones de bacterias, de esta manera el tamaño de las colonias puede variar desde 0,5 a 4,0 mm de diámetro (Vargas y Kuno, 2014).

2.1.5.3 Forma

Las bacterias según su forma pueden ser: esféricas o cocos, alargadas o bacilos y las bacterias curvadas o espirilos también denominadas comas, espiroquetas y vibrias. Algunos cocos, reciben otro nombre, por ser achatados se denominan cocobacilos (Vargas y Kuno, 2014).

2.1.5 Cepa bacteriana

Las cepas son grupos de bacterias con características en común, y diferencias notables con otras especies, las taxoespecies presentan similitud fenotípica, en cambio las especies genómicas presentan un porcentaje alto común en las bases del ADN, y por ultimo las genotípicas gran homología en sus genes secuencialmente (Gobernado y López, 2003).

2.1.5.4 Taxonomía

La taxonomía es la ciencia de clasificación biológica que agrupa organismos según sus afinidades o similitudes. Se incluye la identificación y nomenclatura; los elementos básicos de los caracteres taxonómicos son varios: fisiología, morfología, biología molecular, bioquímica, ecología, y genética; lo que permite compilar una serie de datos direccionados a la caracterización, clasificación y nomenclatura.

Los principales esquemas de clasificación son dos: el primero basado en las características observables de un organismo (fenotípica), y aquellas que tienen en cuenta las relaciones de evolución ancestral de los seres vivos (Gobernado y López, 2003).

2.1.5.5 Identificación bacteriana

Las bacterias suelen ser identificadas por medio de métodos convencionales que se basan principalmente en las características fenotípicas, debido a su asequibilidad. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se encuentran basados en características observables como su morfología, desarrollo, y propiedades metabólicas bioquímicas. En el proceso de identificación tradicional, es fundamental la experiencia del microbiólogo que permita la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial en función de la fiabilidad, del género o de la especie bacteriana que se quiere identificar, el origen del aislado, y del coste de las mismas (Bou et al., 2011).

2.1.6 Suelo

El suelo es un cuerpo natural y dinámico que, a modo de epidermis, cubre la superficie de la tierra. Uno de los recursos naturales de mayor importancia, debido a que realiza varias funciones, destacando la producción de alimentos y, mayormente, su papel como sostén de la vida en el planeta. Tiene un carácter anisótropo cuya formación se inicia a partir de un material parental, que progresivamente se va alterando física y químicamente, bajo unas condiciones climáticas, bióticas y geomorfológicas que actúan a lo largo de un determinado tiempo (Jiménez, 2017).

2.1.7 Contaminación del suelo

Cuando en un suelo se acumulan sustancias a niveles tales que repercuten negativamente en el comportamiento de los mismos, se dice que se “degrada”, de tal modo que las sustancias, a esos niveles de concentración, suponen un nivel tóxico para los organismos del suelo; al tiempo que se produce la pérdida parcial o total de la productividad del suelo (Jiménez, 2017). Según la FAO (2018), los diversos tipos de contaminantes encontrados en el suelo corresponden a la siguiente clasificación:

- Inorgánicos: metales/ metaloide y no metales
- Orgánico: Clorado y no clorado

2.1.8 Metales pesados

El término “metales pesados” se refiere al grupo de metales y semimetales de masa relativamente alta ($> 5 \text{ g / cm}^3$) tales como Pb, Cd, Cu, Hg, Sn y Zn, que pueden causar problemas de toxicidad. Los metales pesados son los contaminantes más difíciles y complejos que se pueden eliminar en la naturaleza. Los metales se acumulan en el tejido de los organismos vivos (Rodríguez et al., 2019).

2.1.5.6 Plomo

Existen compuestos orgánicos e inorgánicos de plomo, entre los que se encuentran el óxido de plomo y el dióxido de plomo, que se utilizan en la fabricación de pinturas, y dentro de los primeros existen diversos compuestos que se emiten al aire durante la combustión del carbón y aceite. Las partículas de plomo pueden viajar largas distancias en la atmósfera y contaminar suelos, ríos, lagos y lagunas (Rodríguez et al., 2016).

Estos compuestos se encuentran en las capas superiores del suelo, excepto en el caso de su forma natural que se encuentran en las capas profundas de la corteza terrestre. Su baja movilidad en el suelo no permite filtrar al subsuelo o capas subterráneas. La interacción del plomo con el suelo se vuelve más fuerte cuando la materia orgánica y los coloides inorgánicos están presentes. Al aumentar el pH del suelo, la interacción con él disminuye y se vuelve más móvil (Blanco et al., 2014).

2.1.5.7 Cadmio

Es considerado un agente tóxico mayormente asociado a contaminación ambiental e industrial, presenta cuatro de las características considerables de un tóxico; los efectos adversos para el hombre y el medio ambiente, bioacumulación, persistencia en el medio ambiente, alta movilidad llegando a viajar grandes distancias con el viento y en los cursos de agua. El cadmio, que es un subproducto del tratamiento metalúrgico de plomo y zinc, se basa en sulfuro de cadmio y se produce en el proceso de óxido de cadmio. Desde un punto de vista ecológico, el cadmio es un elemento relativamente raro en la litosfera. Por su afinidad

química, se encuentra en proporciones muy diferentes junto con el zinc (Ramírez, 2002).

2.1.9 Hidrocarburos

Los hidrocarburos se han considerado como contaminantes perjudiciales para el medio ambiente. La contaminación por hidrocarburos en el suelo impide el intercambio de gases con la atmósfera, afecta a distintos procesos fisicoquímicos; la evaporación y la capilaridad, pueden convertirse en procesos lentos, ocasionando toxicidad en los suelos y aguas contaminadas, dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida (Ordoñez et al., 2018).

2.1.10 Diésel o Gasoil

El diésel también llamado gasoil se producen a partir del petróleo crudo, donde se producen a partir de la torre de destilación. Es uno de los materiales más utilizado en motores diésel industriales, centrales térmicas y barcos.

Como subproducto contiene algunas cantidades de parafina y cera y cuando la temperatura disminuye, la cera comienza a precipitarse, formando cristales de hidrocarburos cíclicos, la estructura de las moléculas de cera cambia de lineal o ramificada a cíclica o forma aromática. Este cambio de forma tiene efectos graves sobre sus puntos de fusión y ebullición y sobre la solubilidad (Farazmand et al., 2016).

2.1.11 Pruebas bioquímicas

Según Fernández et al. (2010) “Las pruebas bioquímicas permiten determinar las propiedades metabólicas del objeto de identificación bacteriana”. Las pruebas bioquímicas son de real importancia en la identificación taxonómica de microorganismos, basada en reacciones químicas diferenciadas manifestando las actividades enzimáticas presentes en los microorganismos de análisis. Indistintamente del tamaño que presenten los microorganismos tienen un sin número de enzimas presentes en un momento dado en el microorganismo, están determinados por un sistema genético de control en su mayoría se ubican intracelularmente (Moreno y Albarracín, 2012).

2.1.5.8 Pruebas primarias

La tinción de Gram permite diferenciar dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas. La técnica se basa en propiedades estructurales de la pared celular de ambos tipos de microorganismos, no siendo una reacción específica. Las bacterias Gram positivas poseen como componente estructural un 90% de peptidoglucano, mientras que las bacterias Gram negativas solo poseen un 10% de estos compuestos. Por lo tanto, si bien ambas pueden ser teñidas por el colorante cristal violeta la diferencia entre ambas radica en su resistencia a la decoloración (Moreno y Albarracín, 2012).

Oxidasa es una prueba que permite determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua

o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones (Fernández et al., 2010).

Catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina. La mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad de catalasa. La prueba se fundamenta en que el peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono (Moreno y Albarracín, 2012).

2.1.12 Biotransformación

La biotransformación como proceso realizado por microorganismos se ha empleado con gran éxito en la obtención de nuevas moléculas y en la modificación estructural de sustratos orgánicos. Las ventajas de su aplicación en la síntesis orgánica están estrictamente relacionadas con la preparación de compuestos ópticamente activos con elevada estereoselectividad bajo condiciones suaves y amigables con el ambiente. Las aplicaciones más importantes de las transformaciones biológicas han sido adoptadas para la producción de aditivos alimenticios, agroquímicos, farmacéuticos y materiales especializados, debido a que sus materias primas y productos deben ser obtenidos mediante procesos de síntesis asimétrica (Santana et al., 2020).

2.1.13 Biorremediación

La biorremediación se describe como un proceso biológico en el que los contaminantes orgánicos se oxidan, descomponen y / o convierten en dióxido de carbono, agua y material celular

(biomasa), principalmente a través del efecto sinérgico de diversos microorganismos Bacterias y hongos. La biorremediación es una tecnología de operación y mantenimiento rentable y también se considera ecológica y sostenible para la remediación de sitios contaminados. El grado de remoción de contaminantes depende de varios factores (presencia de sustrato / fuente de carbono / donante de electrones, aceptor de electrones, macro y micronutrientes, microorganismos con capacidad de degradación, condiciones ambientales, etc.) contenidos en diversos procesos (Martínez y Soto, 2017).

Las estrategias de remediación basadas en procesos microbianos (microrremediación) pueden minimizar la toxicidad y biodisponibilidad de los metales pesados. Estas técnicas incluyen la bioestimulación, que activa la población microbiana nativa; el bioaumentación, que es la introducción artificial de poblaciones viables, bioacumulación con células vivas y bioadsorción por microbianas muertas Incluye biomasa (Beltrán y Gómez, 2016).

2.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.2.1 Aislamiento e identificación de microorganismos de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo en la ciudad de Juliaca

En esta investigación se determinó la presencia de microorganismos nativos de suelos contaminados con hidrocarburos originarios de talleres automotrices en la ciudad de Juliaca. Las muestras se obtuvieron de talleres donde realizan actividades principalmente de mantenimiento de motores a combustible diésel. Se realizó la caracterización fisicoquímica a través de los parámetros: pH,

conductividad, hidrocarburos, cloruros, las sales solubles y la materia orgánica. Se aislaron microorganismos presentes en las muestras donde se encontraron microorganismos Gram negativos correspondientes en gran mayoría a cocos y bacilos. Se identificó a *Bacillus* spp. principalmente, como cepa presente en todas las muestras. Como conclusión se estableció que, indistintamente de los métodos para remediar suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos, la aplicación de sistemas biológicos, podría ser la alternativa con más viabilidad por la diversidad de cepas capaces de biodegradar (Apaza, 2020).

2.2.2 Microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados

Según este estudio los metales pesados y su toxicidad en suelos está relacionada con su disponibilidad y que es asimilada por los seres vivos, y es determinada por características fisicoquímicas (principalmente pH, potencial redox y materia orgánica). Los métodos fisicoquímicos y biológicos son empleadas como técnicas de remediación; estas últimas llamadas biorremediación de suelos, debido a que aprovecha el potencial metabólico de organismos vivos (bacterias y hongos) para la biorremediación.

Los procesos más usados son la precipitación, adsorción, lixiviación y volatilización de metales pesados. Sin embargo, se debe recalcar la importancia de ampliar los estudios sobre la diversidad microbiana en lugares contaminados con metales pesados, que contribuyen a la identificación de cepas con mejor adaptación e incluso mayor capacidad de biorremediación de recursos contaminados (Covarrubias et al., 2015).

Los métodos que principalmente se basan en las propiedades metabólicas de bacterias y hongos para la extracción de contaminantes como metales pesados, son complementarios a los métodos tradicionales. Por ello, es necesario la realización de más estudios sobre la diversidad microbiana de los sitios contaminados por metales pesados, pues es ahí donde pueden surgir cepas mejor adaptadas y con mejores capacidades para ser utilizadas en la biorremediación de estos contaminantes (Covarrubias et al., 2015).

2.2.3 Aislado bacteriano con potencial de biorremediación y análisis de comunidades bacterianas en zonas impactadas con derrame de petróleo en Condorcanqui - Amazonas

Para finalidad de este estudio las muestras de agua y suelo contaminadas con petróleo crudo fueron colectadas de la capa superficial (0 - 15 cm) a partir del derrame de petróleo de agosto del 2016 a la altura del km 364 +900 de la Quebrada de Uchichiangos en el tramo II del oleoducto norperuano en el distrito de Nieva, provincia de Condorcanqui, departamento de Amazonas. Mediante muestreo de conveniencia, se tomó una muestra de 1 kg de suelo (dividida en 3 submuestras) y una de 1 l de agua (dividida en 3 submuestras), se almacenó estéril a 4°C y se cubrió con luz hasta su finalización en las instalaciones del laboratorio de IncaBiotec, ubicado en el departamento de Tumbes, para posteriores análisis microbiológicos y genómicos. Se trataron muestras de suelo: se suspendieron 10 g de muestra en 100 ml de solución salina fisiológica (SSF) y se mantuvo en agitación continua durante un día a 180 revoluciones por minuto (rpm) para extraer el sobrenadante con bacterias resuspendidas (Castillo *et al.*, 2020).

El pre-enriquecimiento consistió en sembrar 10 ml de agua o sobrenadante (para muestras de suelo) en 90 ml de caldo Luria Bertani (LB), suplementado con 1 ml de crudo estéril de la zona del derrame. Se mantuvo a 180 rpm con agitación constante durante 5 días y luego se inoculó el sobrenadante en un caldo de medio salino mínimo (MSM) suplementado con aceite crudo al 1% y se mantuvo la agitación constante a 180 rpm durante 8 horas. Posteriormente se inocularon las diluciones 10⁻⁹ y 10⁻¹² de cada cultivo sembrando en placas Petri con agar MSM, suplementado con 100 µl de aceite crudo, para la selección y purificación de cepas bacterianas (Castillo *et al.*, 2020).

2.2.4 Aislamiento de bacterias con potencialidades para la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados

El aislamiento y purificación de las cepas bacterianas se realizó mediante el método de enriquecimiento secuencial, utilizando petróleo crudo como fuente de carbono y energía. Uso de medios selectivos líquidos King B para *Pseudomonas* spp. Se realizó la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas, así como sus relaciones fenotípicas, para lo cual se utilizó el método de NeighborJoining, se construyó el árbol filogenético a partir de los caracteres. Del yo morfológico, que convierte los datos en una matriz binaria de los valores 1 y 0 (1 = T, 0 = A). Los resultados mostraron una diferencia significativa en las tasas de crecimiento, donde las cepas ARP2 / 1, ARP2 / 2, ARP2 / 3 y DRP6 / 6 se destacaron por mayores tasas de crecimiento, lo que podría conducir a la adaptación al medio. De acuerdo con la caracterización realizada, se seleccionó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a su mejor adaptabilidad y alta capacidad para

degradar hidrocarburos (Morante *et al.*, 2019).

Del ensamblaje bacteriano a los 15 días en cultivo de hidrocarburo King, se recuperaron 5 L, donde se diluyó la muestra 1/107. A partir de muestras de suelo, agua y derrames de petróleo crudo, se purificaron 15 cepas degradantes de hidrocarburos. En el tiempo de evaluación de 2 horas, el mayor crecimiento bacteriano fue observado por el derrame de petróleo aislado DRP6 / 6. Las cepas con la mayor tolerancia a los hidrocarburos provinieron de muestras de agua contaminada con hidrocarburos. Además, se observó un aumento en el crecimiento de las cepas ARP2 / 2 y ARP2 / 3 con halos de crecimiento bacteriano de $7.2 \pm .0$ y 8.2 ± 2.1 mL. Entre los géneros más estudiados, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., ya que pueden producir biosurfactantes y emulsionantes que reducen la tensión superficial entre el aceite y el banco de agua medio. Finalmente, se observó que, durante el agrupamiento de cepas, las cepas ARP2 / 1, ARP2 / 2 mantuvieron una estrecha relación, lo que podría inferir que las dos cepas pueden pertenecer a la misma especie y/o tener características similares a la posibilidad de la degradación de los hidrocarburos (Morante *et al.*, 2019).

2.2.5 Caracterización de bacterias degradadoras de diésel, aisladas de suelos contaminados con petróleo

Para examinar la degradación de los motores diésel, se obtuvo suelo del campus de la Universidad de Mujeres Ewha. Para igualar las partículas de suelo, el suelo se secó al aire, se pasó a través de tamices de 850 y 600 ml y se secó en un horno a 80 °C durante 2 h. Se mezclaron cinco gramos de suelo, ml de UI5 cultivados y 50 µl de aceite diésel, se sellaron a y se cultivaron en una incubadora a 30 °C. Para extraer un total de hidrocarburos de petróleo, se

agregaron 5 ml de hexano a las soluciones. Fluido de cultivo, tres de los cuales se utilizaron cada 6 o 12 h para análisis de GC y para medición de biomasa. La degradación del diésel de nueve aislamientos probados para usando una relación de reducción de hexadecano (C16) de es representativa de la degradación de los compuestos diésel (Hong y Kim, 2015).

Entre los 9 aislamientos probados, IU5 fue capaz de degradarse mejor que diésel. Cuando se agregó diésel como la única fuente de carbono, la tasa de crecimiento UI5 se estimó en 0.11 h) 1, la tasa de descomposición del diésel fue 0.2 g celdas g) 1 d) 1 (0, gl) 1 d) 1), y el rendimiento de crecimiento fue de 0,25 g de celdas diésel). Se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* en base a resultados MIDI, fueron descomponedores más fuertes en un grupo de bacterias aisladas de muestras de suelo contaminadas con petróleo.

Se examinaron las características de crecimiento de este aislado en varios hidrocarburos de petróleo distintos del diésel (datos no mostrados). Se encontró que la cepa IU5 aumentó en tanto en petróleo crudo como en diésel, mientras que mostró una afinidad ligeramente menor por la gasolina, además se encontró que podía degradar muchos otros hidrocarburos, lo que implica que una mezcla de hidrocarburos estimuló el crecimiento, debido a la presencia de más de fuentes de carbono.

Especialmente en este estudio de, encontramos una cepa de *P. aeruginosa* capaz de usar pireno, que tiene la estructura de anillo más compleja entre los PAH de petróleo crudo, como la única fuente de carbono en cultivo puro (Hong y Kim, 2015).

2.2.6 Identificación de microorganismos resistentes al Cd en suelos contaminados con metales pesados

En este estudio a partir de una cepa KC6, identificada como *Bacillus subtilis*, aislada del suelo contaminado con metal alrededor de una mina de pirita al aire libre. KC6 tenía una alta resistencia al Cd (alrededor de 100 mg L⁻¹) y fue capaz de producir sideróforos (0,66 A / Ar) y solubilizar fosfato (21,98 mg L⁻¹). Además, en el experimento óptimo, *Bacillus subtilis* KC6 mostró la mayor capacidad para eliminar Cd con pH 7 y 35 °C, y la revolución tuvo poco efecto sobre la adsorción de *Bacillus subtilis* KC6 CD. Además, *Bacillus subtilis* KC6 tuvo una mayor capacidad de sorción de Cd con un tratamiento de Cd de 10 y 40 mg / L aproximadamente 86,33%, 65,33%, respectivamente (Xie et al., 2021).

Mediante microscopio electrónico de barrido: espectrómetro de dispersión de energía (SEMEDS), espectros de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y análisis de mapeo de elementos, se unió Cd en solución a paredes celulares de KC6 aumentando los grupos funcionales. Además, bajo estrés por Cd, ácidos orgánicos de bajo peso molecular (ácido málico, ácido oxálico, ácido cítrico y ácido succínico) producido por la cepa KC6 aumentó significativamente en comparación con tratamiento sin Cd. Los diversos grupos funcionales y exudados podrían ayudar a KC6 a quelar Cd a ligandos de Cd complejos para que el Cd pueda unirse a la pared celular y transportarse a los órganos celulares y al citoplasma (Xie et al., 2021).

2.2.7 Aislamiento de bacterias tóxicas tolerantes a metales del suelo y examen de su potencial de bioaumentación mediante estudios en macetas en suelos contaminados con cadmio y plomo

La resistencia de los microbios a los metales tóxicos se asocia con los antibióticos. En el presente estudio, los aislamientos que muestran tolerancia a Cd y Pb se encontraron resistentes a amoxicilina, ampicilina, cefalexina, cefixima, cloranfenicol, kanamicina, meticilina y tetraciclina. Cepa de *P. aeruginosa*. Se encontró que SN4 y la cepa SN6 de *B. cereus* eran sensibles a ceftriaxona, gentamicina y ofloxacina.

La zona de máxima inhibición fue observada por *P. aeruginosa* cepa SN5 contra la ofloxacina. Se realizó la identificación de bacterias a partir de muestras de suelo. Entre todos los aislamientos probados, muy pocos pudieron resistir una alta concentración de Cd y Pb en placas de agar nutritivo. La tolerancia bacteriana al cadmio (Cd) y al plomo (Pb) se determinó mediante el método de dilución en agar, donde se añadió en forma de cloruro de cadmio y acetato de plomo (Nath *et al.*, 2018).

La concentración inicial de Cd y Pb en las placas de nutrientes fue de 50 µg / ml y se observó el crecimiento bacteriano mediante el rayado en las placas respectivas. La concentración de metal se incrementó progresivamente de 10 a 15 µg / ml en una placa, y se anotó la CIM cuando los aislamientos no crecen en placas de agar suplementadas con Cd y Pb. Experimentar se realizó por separado para Cd y Pb, tomando cinco réplicas para cada concentración (Nath *et al.*, 2018).

Los discos de antibióticos incluyeron gentamicina (50 µg), amikacina (30 µg), cefalexina (30 µg), meticilina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ampicilina (25 µg), cloranfenicol (10 µg), amoxicilina (10 µg), kanamicina (5 µg), ofloxacina (5 µg) y cefixima (5 µg). Antibiótico. Se incubaron durante 24 a 48 h a 37 C. Se midió el diámetro de las zonas de inhibición y se las cepas se clasificaron como resistentes (R), intermedias (I) o susceptibles (S) siguiendo la tabla de discos de antibióticos estándar.

Las bacterias tolerantes a metales tóxicos se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*. Las cepas de *P. aeruginosa* fueron capaces de reducir significativamente el impacto negativo del Cd y Pb en el suelo, encontrando así una alternativa en la remoción, recuperación y remediación de tóxicos campo de cultivo contaminado con metales (Nath et al., 2018).

2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL

2.3.1 Constitución de la República del Ecuador (2008)

La Constitución del Ecuador de 2008 establece en sus artículos la importancia de velar por la protección de los recursos naturales y su evitación, los cuales se presentan a continuación:

En el Título II de Derechos, Sección segunda, Ambiente Sano en su Art 14, establece:

Que se reconozca el derecho de la población a un medio ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*. Se declara de interés público la preservación del medio ambiente, la preservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la evitación del daño ambiental y la restauración de áreas naturales degradadas. Un aspecto importante de este artículo es que incorpora la dimensión ambiental

y declara de interés público la conservación y preservación del medio ambiente.

TÍTULO VII Régimen del Buen Vivir. Capítulo Segundo Biodiversidad y recursos naturales. En su Sección Primera, Naturaleza y Ambiente:

Art. 397.- En caso de daño ambiental, el Estado actuará de manera inmediata y subsidiaria para velar por la salud y restauración de los ecosistemas. Además de la sanción correspondiente, el Estado reiterará al operador de la actividad que ocasionó el daño las obligaciones que conlleva la reparación integral, en las condiciones y en la forma que establezca la ley. La responsabilidad también recaerá sobre los servidores o asistentes encargados de realizar el control ambiental. Para garantizar el derecho individual y colectivo a vivir en un medio ambiente sano y ecológicamente equilibrado, el Estado se compromete a establecer mecanismos efectivos para la prevención y control de la contaminación ambiental, para la recuperación de los espacios naturales degradados y para el manejo sostenible de los recursos naturales.

2.3.2 Texto unificado de legislación secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA). Reforma del 2015-04-07

Parágrafo II:

Acuerdo Ministerial No.061, referente al recurso suelo establece:

Art.212 Calidad del suelo. Para llevar a cabo una adecuada caracterización de este componente en los estudios ambientales, así como un adecuado control, muestreo y seguimiento, estos deberán realizarse de acuerdo con las metodologías previstas en el Anexo II y demás normativas correspondientes.

La Autoridad Ambiental competente y los órganos del Sistema Nacional Descentralizado de Gestión Ambiental, dentro de sus competencias, verificarán la calidad del suelo de acuerdo con las normas técnicas emitidas al efecto. Constituyen estándares de calidad del suelo, características físico-químicas y biológicas que establecen la composición del suelo y lo hacen aceptable para asegurar el equilibrio ecológico, la

salud y el bienestar de la población (MAE, 2015a).

Art. 213 Tratamiento de suelos contaminados. Se realiza mediante procedimientos validados por la Autoridad Ambiental competente y en cumplimiento de la norma técnica de suelos, residuos peligrosos y demás normativa aplicable. Los sitios de disposición temporal de suelos contaminados deben contar con medidas preventivas efectivas para evitar la dispersión de contaminantes al medio ambiente (MAE, 2015a).

2.3.3 Norma de calidad ambiental. Criterios para la remediación de suelos contaminados. Acuerdo 097/A, 2015

Este Acuerdo emite el Anexo 2 de la Legislación Secundaria Consolidada del Ministerio de Medio Ambiente sobre el estándar de calidad ambiental del recurso suelo y los criterios de recuperación de suelos contaminados. El objetivo principal de la norma es preservar la salud de las personas y garantizar la calidad ambiental del recurso suelo para salvaguardar las funciones naturales en los ecosistemas, frente a actividades antrópicas que puedan modificar su calidad, derivadas de los diversos usos del recurso suelo (MAE, 2015b). En el punto cuatro uno tres de los suelos contaminados existen técnicas de remediación y tratamientos donde se establece que, como tratamientos biológicos independientes del tratamiento adoptado por la norma, los suelos contaminados deben alcanzar los niveles de concentración establecidos en los criterios de remediación de suelos establecidos en la tabla 2 de esta norma; los valores se aplicarán en función del uso del terreno en el que se ubique el área contaminada.

El organismo de control ambiental tendrá la tarea de solicitar los respectivos planes de remediación y el seguimiento de la calidad de los suelos contaminados y de solicitar los registros de seguimiento correspondientes en la medida que se requiera hasta alcanzar los límites establecidos en esta norma (MAE, 2015b).

2.3.4 Plan Nacional del Buen vivir (2017 - 2030)

El Plan Nacional del Buen Vivir, se desarrolló con el fin de construir un Estado plurinacional e intercultural y alcanzar el Buen Vivir de las y los ecuatorianos. Esta investigación está alineada con el tercer objetivo del Plan Nacional para el Buen Vivir 2017-2030, “Toda una vida” del Ecuador.

Objetivo 3. “Garantiza los derechos de la naturaleza de las generaciones presentes y futuras”

Preservar, restaurar y regular el uso del patrimonio natural y social, rural y urbano, que salvaguarda y protege los derechos de las generaciones presentes y futuras.

- Distribuir equitativamente el acceso al patrimonio natural, los beneficios y la riqueza derivados de su uso, y promover la gestión sostenible de los recursos naturales renovables y no renovables.
- Promover y promover buenas prácticas que contribuyan a la reducción, protección, contención y adaptación de la contaminación a los efectos del cambio climático a nivel mundial.
- Promoción de la economía urbana y rural basada en el uso sostenible y de valor agregado de los recursos renovables, promoción de la corresponsabilidad social y desarrollo de la bioeconomía.
- Promover la generación de bioconocimiento como alternativa a la producción primaria de exportación y el desarrollo de

un sistema de bioseguridad que proteja las condiciones ambientales que podrían afectar a los humanos y otros seres vivos.

- Promoción de la producción y el consumo respetuosos con el medio ambiente basados en los principios de la economía circular y la bioeconomía, la promoción del reciclaje y la lucha contra la obsolescencia programada.
- Llevar a cabo una diplomacia verde y una voz proactiva por la justicia ambiental para defender los derechos de la naturaleza.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

La innovación distingue a los líderes
de los seguidores.

Steve Jobs

3.1 Localización

El área de estudio se encuentra ubicada al nororiente del Ecuador, en la provincia Sucumbíos, cantón Lago Agrio, en la parroquia Papayacu, sectores Chone uno y Chone dos (Figura 1). La principal actividad del sector es la extracción petrolera. Esta zona se caracteriza por tener suelos rojos y negros, este último aprovechado con fines agrícolas. Presenta una temperatura promedio de 26 °C con lluvias de hasta 133 mm.

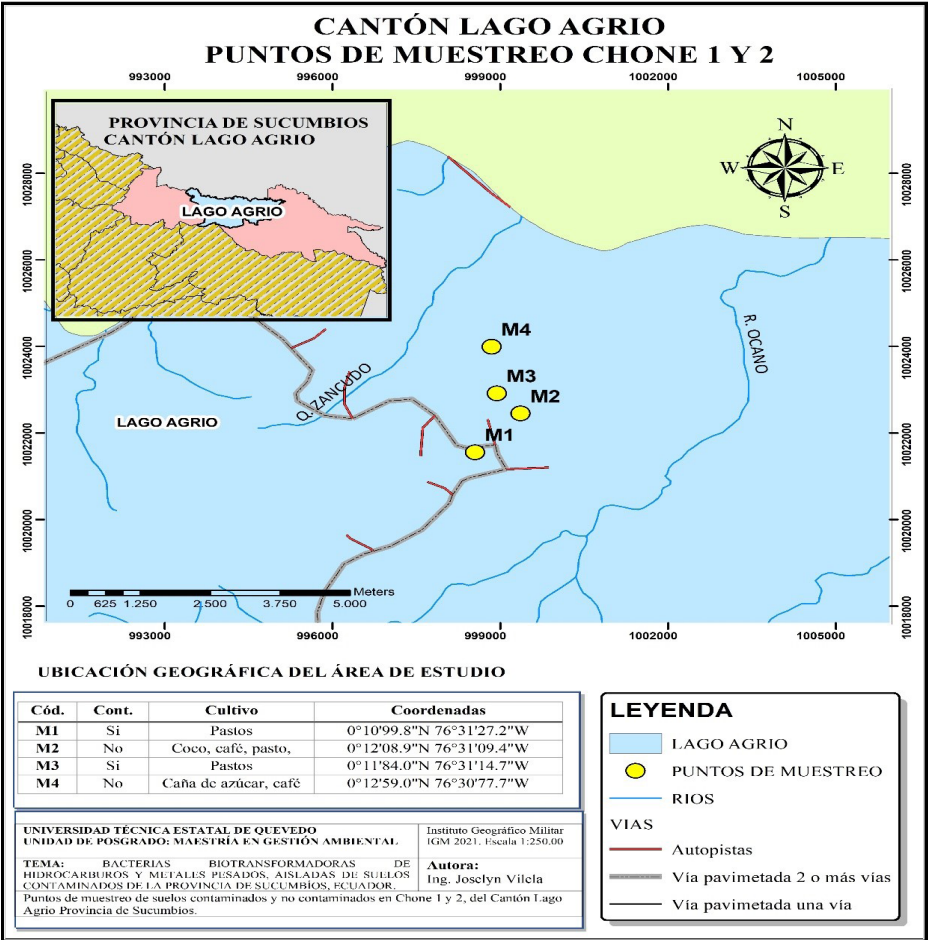


Figura 1. Ubicación de puntos de muestreo en el cantón Lago Agrio, Ecuador.

El procesamiento de las muestras se realizó en los laboratorios de Biotecnología y Microbiología ubicados en la Finca Experimental “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Este se localiza en el Km 7 1 /2 de la Vía Quevedo – El Empalme, cantón Mocache, provincia Los Ríos (01 06' S y 79 29' O) a una altitud de 75 msnm.

3.2 Construcción metodológica del objeto de investigación

3.2.1 Población y muestra

Las muestras se tomaron de cuatro sitios diferentes del cantón Lago Agrio en los sectores Chone 1 y Chone 2. De las muestras, dos corresponden a suelos contaminados por hidrocarburos con contenidos de metales pesados y dos de suelos cercanos con distancias menores a 1 km de las muestras contaminadas (Figura 1).

3.3 Procesamiento y análisis de la información

3.6.1 Fuente de muestreo y toma de muestra

Se siguió la metodología de Osorio (2012), que consistió en muestrear suelos contaminados con hidrocarburos y no contaminados, en la parroquia Papayacu en los sectores Chone 1 y Chone 2 del cantón Lago Agrio. En cada punto se limpió un área de 1600 cm², posteriormente, con una pala se realizó un hoyo en forma de “V” a una profundidad de 20 cm donde se tomó entre 100-200 g de suelo.

Este suelo fue transferido a un balde limpio. Se recolectaron 5 submuestras por cada punto de muestreo del área en estudio. Finalmente, se homogenizaron las muestras en un balde y se transfirió 1 kg de suelo a una bolsa plástica estéril, que fue sellada

y rotulada. Las muestras fueron preservadas y transportadas al laboratorio en hieleras térmicas, con bolsas de gel refrigerante.

3.6.1.1 Caracterización física de las muestras de suelo

Se realizó la identificación textural de las muestras de suelo siguiendo la metodología propuesta por Noellemever et al. (2021). Se colocaron 25g de suelo en la palma de la mano y se incorporó agua por goteo. Se amasó para desarmar todos los agregados y se identificaron características de forma, humedad y plasticidad. Seguido se colocó la porción de suelo entre el pulgar y el índice, presionando suavemente el suelo hacia arriba con el pulgar, para identificar si se genera una cinta.

Por último, se tomó una pequeña cantidad de suelo que fue humedecida de manera excesiva sobre la palma de la mano, identificando si es mucho, medianamente o poco áspero.

Para el análisis visual de color se empleó el sistema propuesto por Munsell (2000). Se identificó el color mediante la comparación con el conjunto de cartas. Siguiendo la metodología propuesta seco como en húmedo y se comparó con las cartas, donde se dispuso el color de acuerdo a las caras de la porción y para aquellos que presentaron tonalidades distintas y manchas, fue descrita su coloración por separado empezando por el más abundante.

3.6.2 Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

Para el procesamiento de muestras se utilizaron metodologías estandarizadas para el análisis de suelos propuestas por Fernández Linares (2006). Para el aislamiento de las cepas se tomó 1 ml del homogenizado (previamente obtenido durante el procesamiento

de la muestra), y se realizaron diluciones seriadas en tubos falcon estériles de 15 ml con agua destilada estéril (Figura 2).

Posteriormente, para la siembra se utilizó el método de dispersión en placa, diseminando alícuotas de 0.1 ml de las diluciones (por triplicado). Se utilizaron medios de cultivo generales y específicos para favorecer el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias, por ejemplo *Pseudomonas* spp.

Las muestras se incubaron a una temperatura de 35°C por 24-48 h. Adicionalmente, se aplicaron técnicas para favorecer el crecimiento de *Bacillus* spp., ya que este género de bacterias presenta potencial como biorremediador.

Para lograr esto, brevemente, se tomó una fracción de la solución stock de las muestras procesadas de suelo, y se sometieron a 100°C por 10 min, con la finalidad de eliminar células vegetativas bacterianas y favorecer la formación de endosporas (característica de *Bacillus* spp).

Pasando el tiempo, se tomaron alícuotas de 0.1 ml y se sembraron por el método de dispersión en placa, en medio Trypticasein Soy Agar para favorecer el crecimiento de las células vegetativas. Se incubaron a 35°C por un lapso de 24-48 h en constante movimiento (Figura 2).



Foto 1. Diluciones a partir de las muestras de suelo.

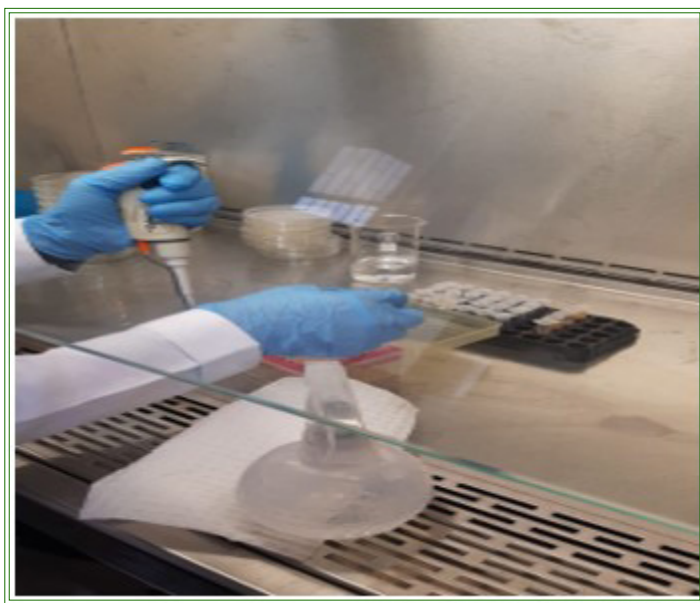


Foto 2. Siembra en cajas Petri en medio de cultivo King B.



Foto 3. Siembra en cajas Petri en medio de cultivo TSA.

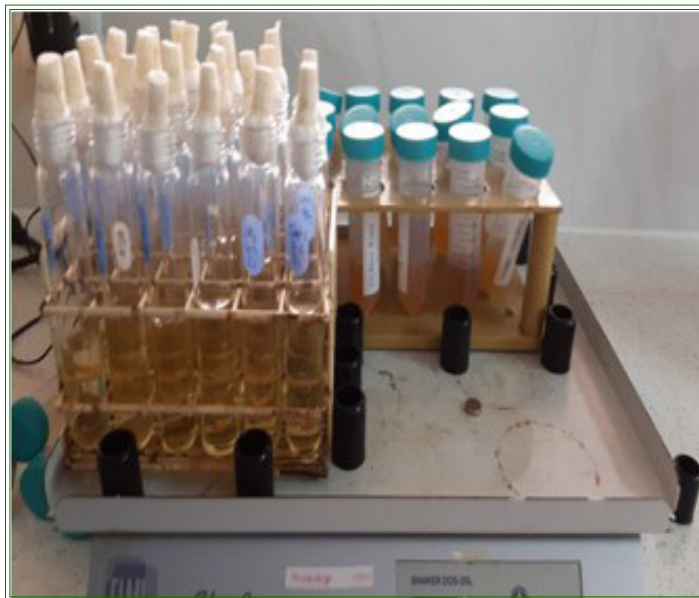


Foto 4. Crecimiento de bacterias purificadas en medio líquido.



Foto 5. Conservación de cepas purificadas.



Foto 6. Cepas conservadas al 20% de glicerol

Figura 2. Fotografías del aislamiento, purificación y conservación de cepas bacterianas.

3.6.2.1 Caracterización macroscópica

Para la caracterización morfológica se inició con el crecimiento de cepas puras mediante la metodología de Castañeda (2019), que consistió en estriar una cepa en los medios de cultivo King Agar B y Trypticasein Soy Agar, incubada durante 48 h a 28° C. Posteriormente, se describió la morfología por su forma, elevación y borde según los criterios en la tabla de Pérez y Mota (2006).

3.6.2.2 Caracterización microscópica

- **Tinción de Gram**

Se realizó la tinción de Gram (Gram, 1884) a las cepas purificadas. Para este análisis se utilizó un kit comercial (Cat. # 212539, BD & Company, Franklin Lakes, NJ E.U.A).

- **Catalasa**

Para la determinación de catalasa se siguió la metodología de MacFaddin (2003). Se fijó una colonia en un portaobjeto, se agregó 100 µl de peróxido de hidrógeno sobre las colonias y se dejó reaccionar por 10 s. Los valores sobre la reacción se definieron de la siguiente manera: (-) sin reacción, (+) reacción, (++) reacción alta.

3.6.2.3 Resistencia de antibióticos

Se evaluó la resistencia a antibióticos de amplio espectro (cloranfenicol, ampicilina y penicilina) siguiendo la metodología Appelbaum et al. (1977); Sutherland y Rolinson (1964). Las bacterias aisladas se mantuvieron en caldo de cultivo King Agar B y Tryptic Soy Broth, se incubó a 180 rpm por 48 h, se recuperaron 20 µl de cada cultivo bacteriano siendo inoculadas y esparcidas con el asa de DIGRAISKY en cultivo King Agar B sólido y

Trypticasein Soy Agar. Finalmente, se colocó discos de papel de filtro Whatman ® No 1 de 5 mm humedecidas con una solución de 20 ppm de antibióticos e incubadas a 28 °C durante 24 h. Se observó la presencia o ausencia del halo de inhibición (Ahmad et al., 2014) (Figura 3).

3.6.2.1 Caracterización macroscópica

Para la caracterización morfológica se inició con el crecimiento de cepas puras mediante la metodología de Castañeda (2019), que consistió en estriar una cepa en los medios de cultivo King Agar B y Trypticasein Soy Agar, incubada durante 48 h a 28° C. Posteriormente, se describió la morfología por su forma, elevación y borde según los criterios en la tabla de Pérez y Mota (2006).

3.6.2.2 Caracterización microscópica

- **Tinción de Gram**

Se realizó la tinción de Gram (Gram, 1884) a las cepas purificadas. Para este análisis se utilizó un kit comercial (Cat. # 212539, BD & Company, Franklin Lakes, NJ E.U.A).

- **Catalasa**

Para la determinación de catalasa se siguió la metodología de MacFaddin (2003). Se fijó una colonia en un portaobjeto, se agregó 100 µl de peróxido de hidrógeno sobre las colonias y se dejó reaccionar por 10 s. Los valores sobre la reacción se definieron de la siguiente manera: (-) sin reacción, (+) reacción, (++) reacción alta.

3.6.2.3 Resistencia de antibióticos

Se evaluó la resistencia a antibióticos de amplio espectro (cloranfenicol, ampicilina y penicilina) siguiendo la metodología Appelbaum et al. (1977); Sutherland y Rolinson (1964). Las bacterias aisladas se mantuvieron en caldo de cultivo King Agar B y Tryptic Soy Broth, se incubó a 180 rpm por 48 h, se recuperaron 20 µl de cada cultivo bacteriano siendo inoculadas y esparcidas con el asa de DIGRALSKY en cultivo King Agar B sólido y Trypticasein Soy Agar. Finalmente, se colocó discos de papel de filtro Whatman® No 1 de 5 mm humedecidas con una solución de 20 ppm de antibióticos e incubadas a 28 °C durante 24 h.

Se observó la presencia o ausencia del halo de inhibición (Ahmad et al., 2014) (Figura 3).

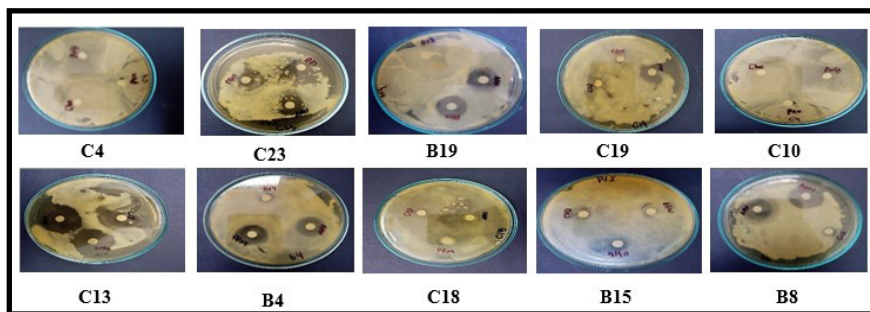


Figura 3. Resistencia de las cepas bacterianas a los antibióticos cloranfenicol, ampicilina y penicilina. Se observan los halos de inhibición de crecimiento.

3.6.2.4 Ureasa

Para determinar la actividad ureolítica se siguió la metodología de Brink, (2010). Se inoculó una colonia bacteriana en 15 ml medio Cristensen's Urea Agar [(g/L): peptona 1 g, dextrosa 1g, cloruro de sodio 5 g, fosfato de potasio 2g, urea 20g, rojo fenol 0.012g, agar 15 g]. Posteriormente, se incubó a 27 C por 48 h. La producción de ureasa se determinó cualitativamente mediante las siguientes características: (-) sin reacción, color amarillo, (+) reacción, color rosado tenue, (++) reacción moderada (+++) reacción alta (Figura 4).

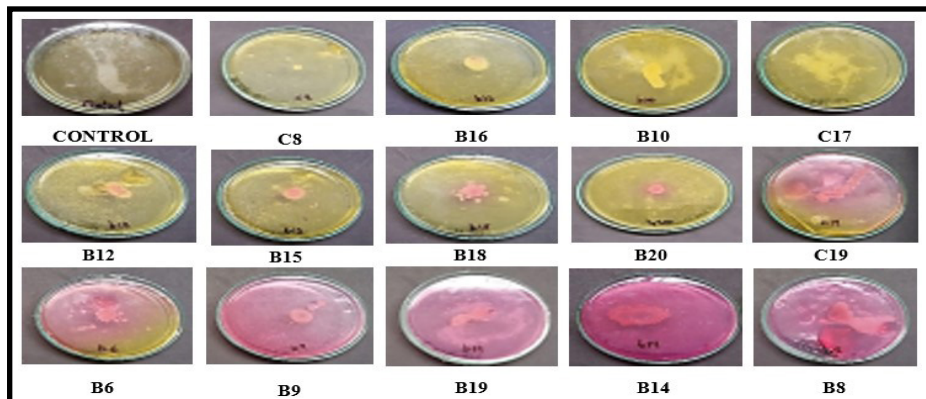


Figura 4. Reacción de las cepas bacterianas en prueba de ureasa.

3.6.2.5 Adaptabilidad bacteriana en muestras contaminadas con hidrocarburos

Para la adaptabilidad bacteriana en muestras del suelo contaminado con hidrocarburos se siguió la metodología de Stefani et al. (2015) donde se suspendió 1 ml de cultivo bacteriano pre-cultivado (1×10^8) en 9 ml de agua desionizada estéril y se agitó en vórtex. A partir de esta solución stock, se realizaron diluciones en serie hasta 10^{-2} . Se sembraron por duplicado en medio de cultivo Trypticasein Soy Agar TSA y King B modificado (se redujo al 50% el contenido

de peptona y triptona, con un volumen de diésel de 25ml/L de medio de cultivo como fuente de carbono). Las muestras fueron incubadas a 28 C durante 72 h. Se determinaron como positivas las bacterias que tuvieron crecimiento en el medio de cultivo.

3.6.3 Tolerancia de los microorganismos a metales pesados e hidrocarburos

3.6.3.1 Aislados bacterianos tolerantes al cadmio

Para el ensayo de bacterias tolerantes a cadmio se siguió la metodología de Bravo et al. (2018). Esta consistió en seleccionar 11 aislados bacterianos con mayor actividad catalítica, ureolítica y de resistencia antibiótico. Se precultivaron las cepas en estudio en medio de cultivo King B durante 24 horas a 170 rpm. Luego se transfirió 100 µl con una concentración celular de 1×10^8 en 25 ml de cultivo líquido King B con 6 ppm de nitrato de cadmio Cd (NO₃)₂. Se evaluaron a las 24, 168 y 240 h las siguientes variables: la densidad óptica, el pH, la conductividad eléctrica y la temperatura. Dentro del estudio se tomaron tres réplicas para cada variable.

3.6.3.2 Aislados bacterianos tolerantes a hidrocarburos

Para el experimento de bacterias tolerantes a hidrocarburos se siguió la metodología de Stefani et al. (2015), que consistió en seleccionar 11 bacterias con capacidad a desarrollarse en medio de cultivo sólido King B y Tryptic Soy Broth (TSB), contaminado con 12 ml/L de hidrocarburo. Se escogió la colonia en medio de cultivo contaminado y se traspasó a tubos falcon de 25 ml de medio de cultivo con 24 ml/L de diésel. Se evaluaron a las 24, 168 y 240 h las siguientes variables: la densidad óptica, la UFC y el pH. Dentro del estudio se tomaron tres réplicas para cada variable.

3.6.3.3 Medición de la Densidad óptica (DO) y (UFC/ml)

La D.O. se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro marca Unico® bw-54 a 600 nm de longitud de onda (DO₆₀₀ nm). Se utilizaron cubetas de cuarzo en las cuales se colocaron con la ayuda de una micropipeta 3 ml de la muestra del medio incubado, usando el medio de cultivo King B sin inoculante como control. Este proceso se realizó por triplicado para cada uno de los aislamientos bacterianos. Se realizó un conteo de microorganismos viables en placa (determinación de las UFC/ml; unidades formadoras de colonia por mililitro), el cual se determinó mediante el método de recuento en placa por siembra de gotas en superficie (Miles et al. 1938; Sharpe y Kilsby, 1971) o técnica de la microgota. Para esto se prepararon una serie progresiva de diluciones, donde se colocaron 270 µl de H₂O estéril y 30 µl del cultivo incubado en tubos eppendorf. Este procedimiento se repitió hasta el factor de dilución -6.

3.6.4 Evaluación de interacción antagónica entre aislados bacterianos

La evaluación in vitro del antagonismo entre los microorganismos se realizó mediante la metodología propuesta por Bauer et al. (1966). Se seleccionaron cinco bacterias con mayor tolerancia a cadmio e hidrocarburo. Seguidamente se tomó una colonia de cultivo puro y se estrió sobre el medio de cultivo King B sólido y TSA en una posición vertical. Posteriormente, las demás cepas se estriaron de manera cruzada, se dejaron incubar a una temperatura de 28 C durante 48 h. Se evaluó como positiva la cepa que tuviese crecimiento sobre las demás bacterias, caso contrario si existía inhibición se reportó como negativo.

3.6.5 Análisis estadístico

Para el análisis de conglomerados se usó el software Statagraphics Centurión 16.103 versión en español, proporcionando clasificaciones y tipologías en los grupos de observación, destinadas a encontrar conjuntos de datos similares entre sí. En el proceso de conformación de grupos todas las variables evaluadas en los experimentos fueron clusterizadas a partir del método de la varianza mínima o enlace de Ward, lo que permitió seleccionar las cepas con mejor respuesta en las pruebas morfológica y bioquímicas, mismas que fueron utilizadas para los bioensayos de resistencia y estrés metálico.

Los datos obtenidos de la evaluación de parámetros en las pruebas de estrés metálico y resistencia en medios contaminados con hidrocarburo, fueron sometidos a los análisis de varianza (ANOVA), y comparación múltiple de Tukey en la búsqueda de diferencias ($p < 0,05$). Para este análisis se empleó el software estadístico SPSS Statistics 25.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inteligencia consiste no solo en el conocimiento,
sino también en la capacidad de
aplicarlo en la práctica.

Aristóteles



4.1. Aislamiento, caracterización y purificación de bacterias a partir de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados

Se identificaron las características físicas de las cuatro muestras de suelo recolectadas, presentando los siguientes resultados según su textura, tonalidad y material incorporado. La muestra M1 extraída de una zona cercana a pozos petroleros presentó una mezcla de suelo y crudo de petróleo de tonalidad Amarillo- naranja con agregados de color negro y textura arcillosa. La muestra M2 extraída de una zona agrícola, presentó un tono pardo oscuro y textura arcillosa.

La muestra M3 de una zona en recuperación presentó una tonalidad amarilla y una textura franco- arcillosa y la muestra M4 de una zona agrícola con una tonalidad café- rojiza tuvo una textura franco.

A partir de los aislados microbianos se recuperaron 23 cepas bacterianas en medio de cultivo King B Agar y 22 en medio de cultivo Trypticasein Soy Agar, obteniendo un total de 45 cepas. Se obtuvieron 17 aislados bacterianos de la M2 (39%), 14 aislados bacterianos de la M1 (31 %), siete aislados bacterianos de la M3 (15%) y siete aislados bacterianos de la M4 lo que representa el 15% (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las muestras y denominación de los aislados microbianos extraídos de suelos contaminados en la provincia Sucumbíos, Ecuador.

PUNTOS DE MUESTREO	MUESTRA	CARACTERÍSTICA DE LA MUESTRA	CLAVE DE LOS AISLADOS		CANT. DE CEPAS
M1	MUESTRA CONTAMINADA CHONE 1	Suelo arcilloso Amarillo-naranja Mezclado con crudo de petróleo	D ² C1, D ⁴ C2, D ⁴ C3, D ² C4, D ⁶ C5, D ² C12,	MB6, D ² B4, D ² B7, D ⁴ B1, D ⁴ B2, D ⁴ B3, D ⁴ B5, D ⁶ B8	14 (31%)
M2	ZONA AGRÍCOLA CHONE 1	Suelo arcilloso Pardo oscuro	D ² C7, D ⁴ C8, D ⁴ C9, D ⁴ C10, D ⁴ C11, D ⁶ C6 M2C20, M2TC21, M2TC23	M2B15, M2B16, D ² B12, D ² B13, D ² B14, D ⁴ B9, D ⁴ B11, D ⁶ B10	17(39%)
M3	ZONA EN RECUPERACIÓN CHONE 2	Suelo franco-arcilloso Color amarillo	D ⁶ C22, D ² C13, D ² C14, D ² C15	D ² B17, D ² B18, D ² B19	7 (15%)
M4	ZONA AGRÍCOLA CHONE 2	Suelo Franco Color café- rojizo	D ² C16, D ² C17, D ⁴ C18, D ⁴ C19	D ² B20, D ² B21, D ² B22	7 (15%)

Denominación en la clave: C- Medio de cultivo King B; B- medio de cultivo Trypticasein Soy Agar (TSA). Superíndices 2,4 y 6- factor de dilución; M- homogenizado sin dilución.

4.1.1. Caracterización morfológica y bioquímica

Las bacterias aisladas fueron evaluadas según sus caracteres morfológicos destacando las siguientes características según su forma, elevación y borde: circulares y puntiformes; planas y elevadas; enteras y lobuladas, respectivamente (Tabla 2 y 3). En cuanto a las unidades formadoras de colonias, se obtuvo la concentración celular de los aislados bacterianos entre 3×10^{10} y 4×10^9 UFC/ml. La tinción Gram solo identificó a las cepas bacterianas B5, B3, B7, B15, B18 desarrolladas en Trypticasein Soy Agar, como bacterias grampositivas, mientras que las demás cepas bacterianas desarrolladas tanto en King B y TSA fueron gramnegativas. En los ensayos de caracteres bioquímicos (Tabla 2 y 3), varios aislados mostraron diferente comportamiento en la producción de catalasa, ureasa, resistencia a diésel y tolerancia a los antibióticos (cloranfenicol, ampicilina y penicilina). Estos se seleccionaron para ser sometidos a otros ensayos. Sin embargo, algunas bacterias no presentaron rasgos de degradación, producción y tolerancia a los antibióticos y fueron descartadas.

Tabla 2. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas aisladas en King Agar B, provenientes de suelos contaminados de la provincia Sucumbíos, Ecuador.

MUESTRA	TIEMP O	COD. CEPA	UF C/g	FORMA			ELEVACIÓN										F. BORDE				CATA LASA	TINCIÓ N GRAM	COLOR	AMP	PEC	UR E	G.OI L
				C F IR			P L	E V	C N	P V	E T	D R	O L	F L													
				R	L	F																					
M1 PUNTO CONTAMINA DO/CHONE 1	24H	C1	1E+10	+						+							+				-	-	+	-	++		
	24H	C12	2E+10							+								-				-	++	-	-		
	24H	C2	2E+10		+							+						++				++	++	-	++		
	24H	C3	1E+10	+						+							+				-	+	++	-	+		
	24H	C4	8E+09	+						+							-				++	++	++	-	+		
M2, ZONA AGRÍCOLA CERCANA	24H	C5	7E+09	+													++				+	+	+	-	++		
	24H	C7	3E+10							+							+				++	++	++	-	+		
	24H	C8	1E+10	+						+							++				+	+	+	-	++		
	24H	C9	8E+09	+						+							+				-	+	+	-	++		
	24H	C10	1E+10	+								+					+				+	+	++	-	++		
	24H	C11	4E+09	+						+							++				+	+	-	-	+		
	24H	C6	2E+10	+						+							+				++	++	++	-	-		
	24H	C20	1E+10		+							+					++				+	+	-	-	+		
	24H	C21	2E+10	+						+							++				+	++	++	-	++		
	24H	C23	8E+09	+						+							++				-	-	-	-	++		
M3 POZO EN RECUPERAC IÓN	48H	C22	1E+10	+						+							++				+	+	++	-	++		
	24H	C13	5E+09		+											+	++				-	+	-	-	++		
	24H	C14	7E+09		+										+	+	+				+	+	+	-	+++		
	24H	C15	4E+10		+					+							++				+	++	++	+	++		
	48H	C16	2E+10	+													+				-	-	-	-	++		
M4 ZONA AGRÍCOLA CERCANA	48H	C17	1E+10	+						+						++					-	-	-	-	+++		
	48H	C18	3E+10	+								+				+	++				+	++	++	-	+++		
	48H	C19	1E+10		+					+						+	++				+	++	++	+	+		
																	++				++	++	++	+	+		

CR: circular, FL: filamentosa, IR: irregular, PL: plana, EV: elevada, CN: convexa, PV: pulvinada, ET: entera, OD: ondulada, ER: erosionada, FL: filamentosa, CLOR: cloranfenicol, PEC penicilina, URE: ureasa, G.OIL: Gasoil o Diésel.
+: producción normal, ++: producción moderada, +++: producción alto

Tabla 3. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas aisladas en Trypticasein Soy Agar (TSA), provenientes de suelos contaminados de la provincia Sucumbíos, Ecuador.

MUESTRA	TIEMP O	COD. CEPA	UF C/g	FORMA			ELEVACIÓN										F. BORDE			CATA LASA	TINCIÓ N GRAM	CLOR	AMP	PEC	UR E	G.OI L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
				P			E	C	P	V	N	V	E	L	E	R	I																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
				U	R	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
M1 PUNTO CONTAMINA DO/CHONE 2	24H	B6	1E+10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

PU: puntiforme, CR: circular, IR: irregular, PL: plana, EV: elevada, CN: convexa, PV: pulvinada, ET: entera, LB: lobulada, ER: erosionada, RI: rizada, CLOR: cloranfenicol, PEC penicilina, URE: ureasa, G.OIL: Gasoil o Diésel.
+: producción normal, ++: producción moderada, +++: producción alto

El dendrograma obtenido mostró la relación existente entre las cepas según las variables escogidas, siendo el más representativo el clúster que encierra las cepas B15, C6, C15, B8, C21, C19, B12, B14, C7 y B20 (cercano al 75%) (Figura 5).

Estas fueron seleccionadas para la aplicación de bioensayos *in vitro* de resistencia a metales pesados.

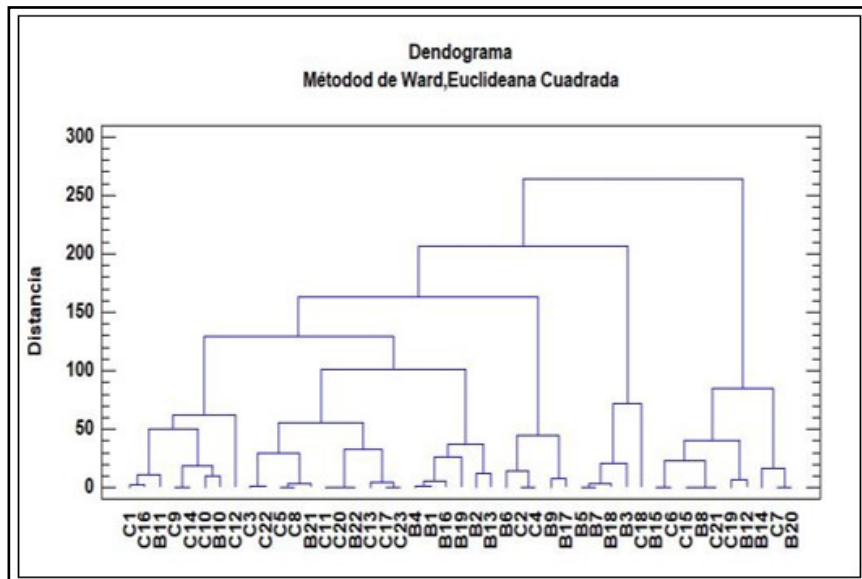


Figura 5. Dendrograma de agrupación de cepas bacterianas según los resultados de pruebas bioquímicas y morfológicas para muestras de suelo contaminado de la provincia Sucumbíos, Ecuador.

4.2. Identificación de bacterias con capacidad para biotransformar hidrocarburos y metales pesados en bioensayos in vitro

4.2.1. Degradación de hidrocarburos in vitro

Apartir del cribado bioquímico de preseleccionamiento microbiano, se tomaron 11 bacterias de mayor relevancia para determinar el crecimiento celular bacteriano en condiciones sin contaminación y con contaminación sometidas a 20ml/lt de diésel. El tamaño de la población bacteriana se determinó por el método de recuento en placas Petri. En condiciones sin contaminación de hidrocarburos, se obtuvo un crecimiento poblacional similar entre la cepa B10 (concentración de $1,65 \times 10^{10}$ UFC/ml), C17 (concentración de $1,60 \times 10^{10}$ UFC/ml) y C16 (concentración de $1,45 \times 10^{10}$ UFC/ml). En cambio, en los ensayos de contaminación de hidrocarburos solo la cepa B20 tuvo el mayor aprovechamiento de este elemento como única fuente de energía y carbono, proporcionando un crecimiento poblacional alto con una concentración de $2,50 \times 10^{10}$ UFC/ml). Este crecimiento superó a los demás tratamientos que consiguieron un crecimiento poblacional bajo (Figura 6).

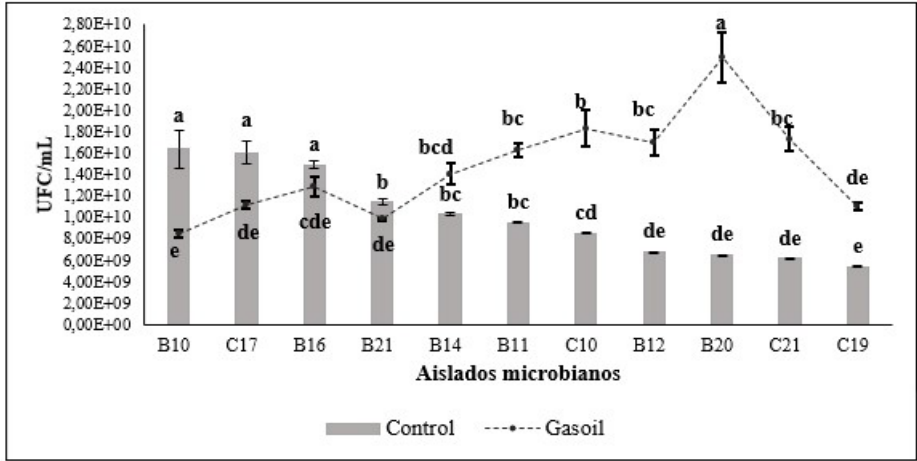
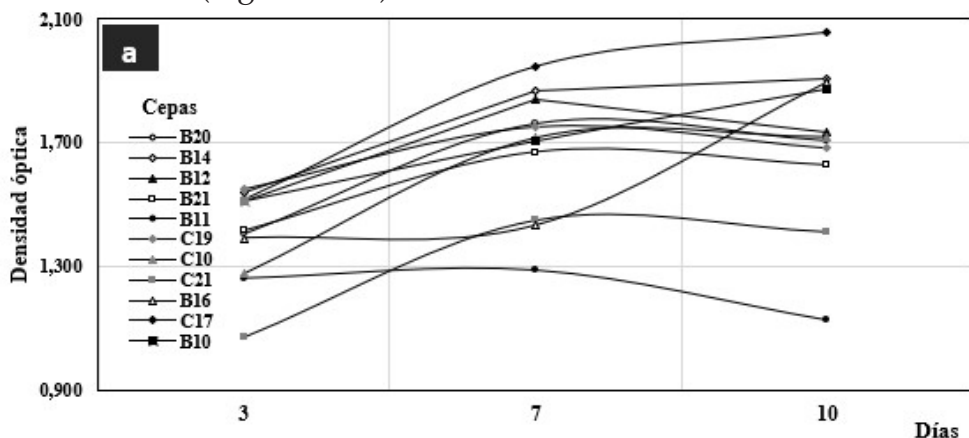


Figura 6. Recuento de microorganismos en muestras de suelo con y sin hidrocarburos en los sistemas de medio de cultivo sólido. Las barras y los puntos denotan la media y la línea vertical muestra el error estándar. Letras diferentes denotan significancia estadística con la prueba de Tukey (*a posteriori*).

4.2.2. Capacidad de crecimiento

Durante el tiempo de incubación de 3, 7 y 10 días se observó una diferencia significativa en el crecimiento de cepas bacterianas preseleccionadas de diferentes fuentes de contaminación y también la reducción de la capa aceitosa (Figura 7). Los aislados C17, B14 y B10, en condiciones sin contaminación de hidrocarburos (Figura 7a), obtuvieron una densidad óptica de 2.058 a 1.876 al décimo día después de la inoculación.

Sin embargo, las cepas B12, B16 y C17 se destacaron eficientemente por su crecimiento acelerado destinado a la inducción de oxigenasas de función mixta y otras enzimas catabólicas esenciales para la biodegradación de hidrocarburo en el medio de cultivo, con valores de densidad óptica de 1.75 a 1.60 superando a los demás tratamientos que mostraron una disminución lenta en su crecimiento (Figura 7 a-b).



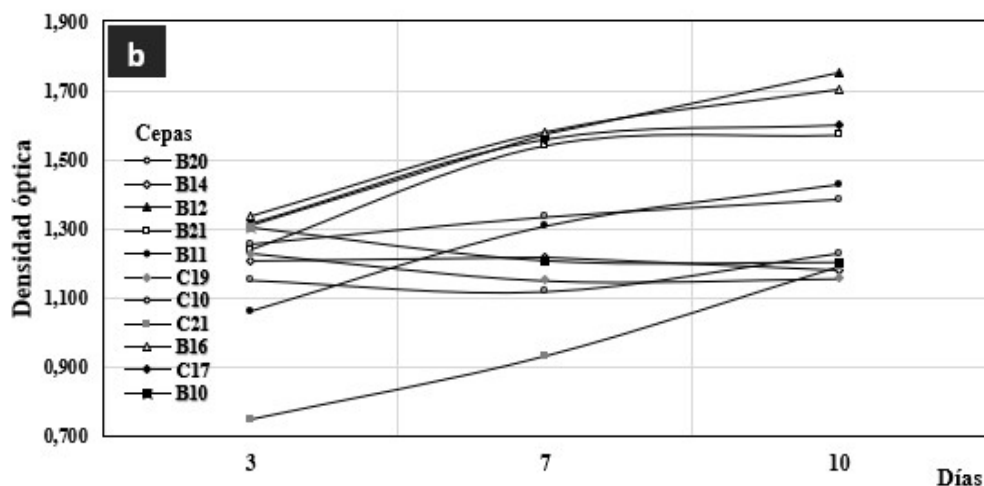


Figura 7. Curva de crecimiento de la comunidad bacteriana en condiciones: **a.** control, **b.** hidrocarburo. Los puntos muestran la media de los datos.

4.2.3. Potencial de hidrógeno (pH)

Los ensayos sin hidrocarburos tuvieron un pH con rangos que van de 8.07 a 7.25 por parte de las bacterias C17, B14, B16 y B10 al décimo día después de la inoculación (Figura 8a). En los tratamientos sometidos a contaminación con hidrocarburos, solo las cepas B12, B14, B16 mantuvieron rangos de 7.53 a 7.06 de pH al (ver Figura 8b).

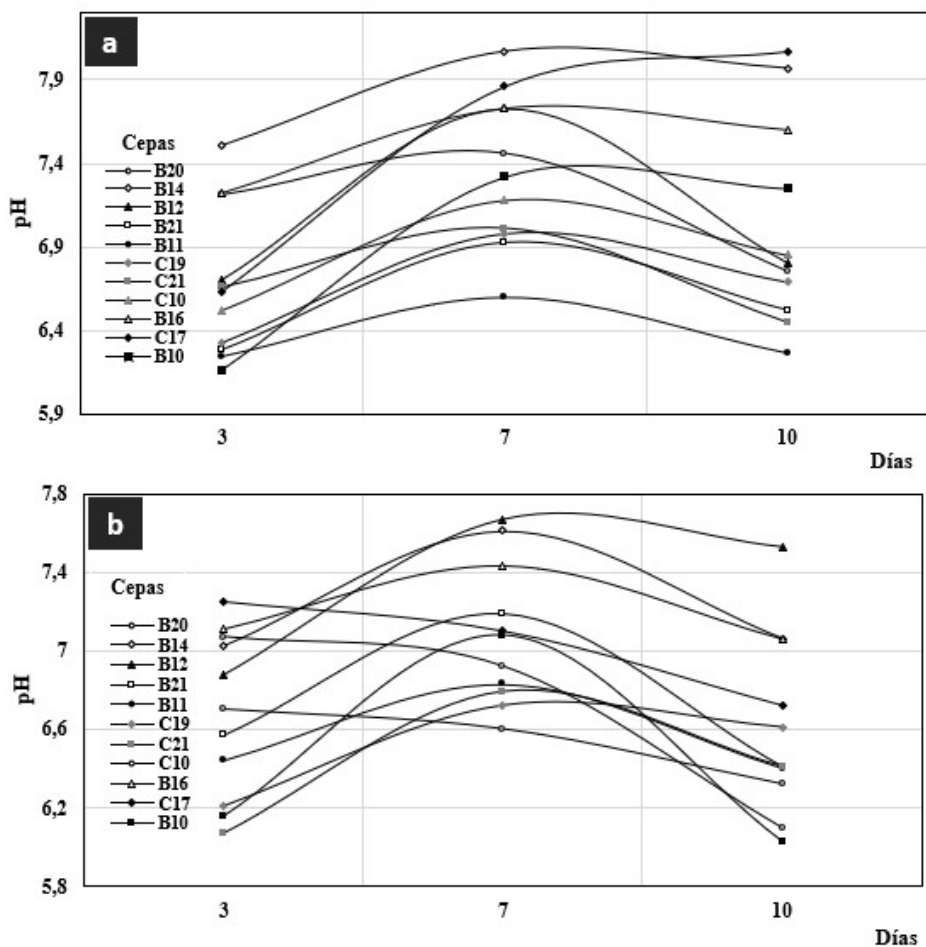


Figura 8. Potencial de hidrógeno en bioensayos de bacterias seleccionadas de condiciones: **a.** control, **b.** hidrocarburo. Los puntos muestran la media de los datos.

4.2.4. Adaptación de los microorganismos a condiciones con/sin hidrocarburos

La adaptabilidad de los microorganismos en condiciones con/sin contaminación que utilizan el hidrocarburo como única fuente de carbono y energía para su óptimo crecimiento celular es un factor importante. En el contenido celular en condiciones

sin contaminación por hidrocarburos, las cepas B10, C17 y B16 fueron las mejores, son similares valores entre ellas ($1,64$ a 1.49×10^{10} UFC/ml) (Figura 9a). A diferencia de las condiciones de contaminación con hidrocarburos, hubo variaciones significativas, observándose el mayor contenido de crecimiento celular ($2,50 \times 10^{10}$ UFC/ml) en la cepa B20 (Figura 9b). La producción de biomasa celular en condiciones sin contaminación de hidrocarburos fue estadísticamente similar en todos los tratamientos de bacterias seleccionadas, en cambio en condiciones de contaminación con hidrocarburos existieron diferencias significativas por parte de la cepa B14 con un incremento celular de 0.130 g seguido de la cepa B10 que obtuvo un valor bajo de 0.110 g (Figura 9 a-b).

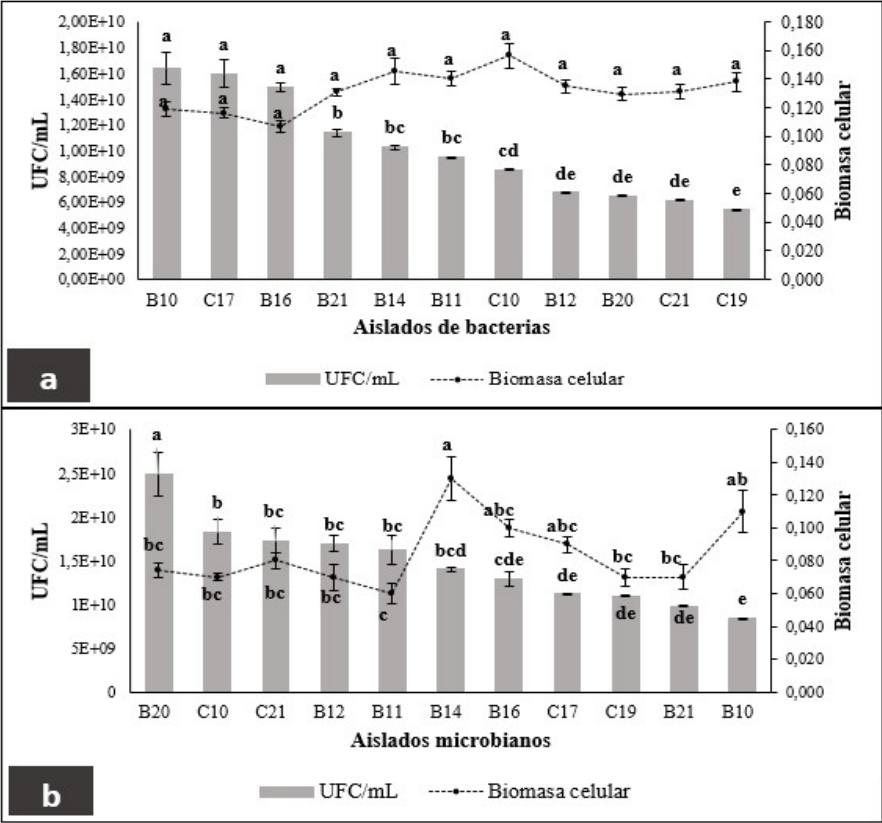


Figura 9. Cinética de descontaminación y producción de biomasa celular de bacterias en medios de cultivo en condiciones: **a.** control, **b.** hidrocarburo. Las barras y los puntos denotan la media y la línea vertical muestra el error estándar. Letras diferentes denotan significancia estadística, con la prueba de Tukey (*a posteriori*).

4.2.5. Análisis de curva de crecimiento en estrés metálico

Tras la incubación por 10 días, para determinar el crecimiento bacteriano en medios contaminados y controles, se realizó la prueba de absorbancia a 600 nm a los aislados seleccionados. La eficiencia de la cepa C7 en presencia de Cd a 6 ppm demostró su tolerancia a la presencia de metal pesado. El crecimiento máximo de la cepa se observó al décimo día de incubación, seguido de las demás bacterias que consiguieron un crecimiento celular con rangos de absorbancia que van de 1.842 a 1.555 en comparación con el control.

A esto se exceptúan las cepas C15, C19, C6 y C21 (Figura 10). En cuanto a los controles se observaron valores heterogéneos de absorbancia destacando el mayor crecimiento de las cepas C7, C6 y C19 con valores entre 1.286 y 1.423 y la C15 que presentó el crecimiento más lento con respecto a las demás (Figura 11).

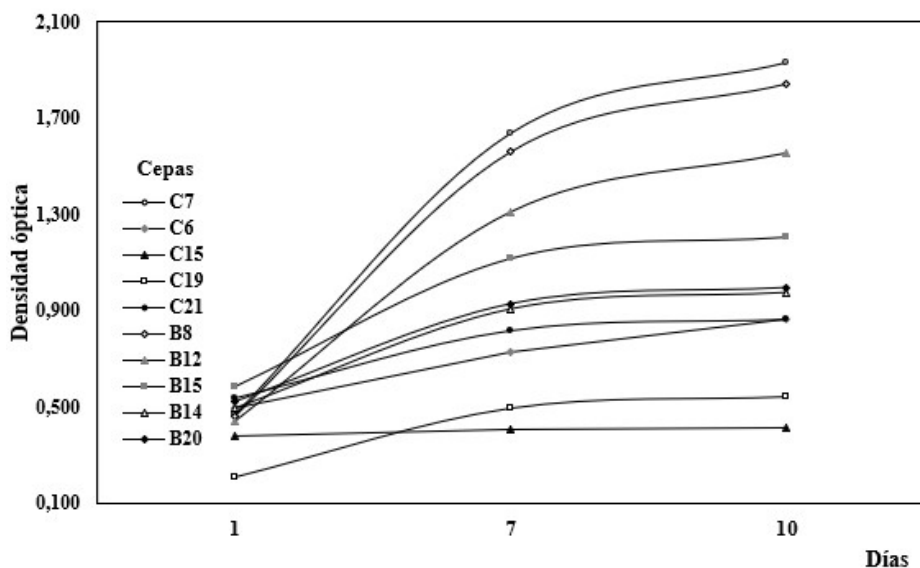


Figura 10. Cinética de crecimiento bacteriano durante 10 días de incubación incorporado cadmio a 6 ppm. Los puntos muestran la media de los datos.

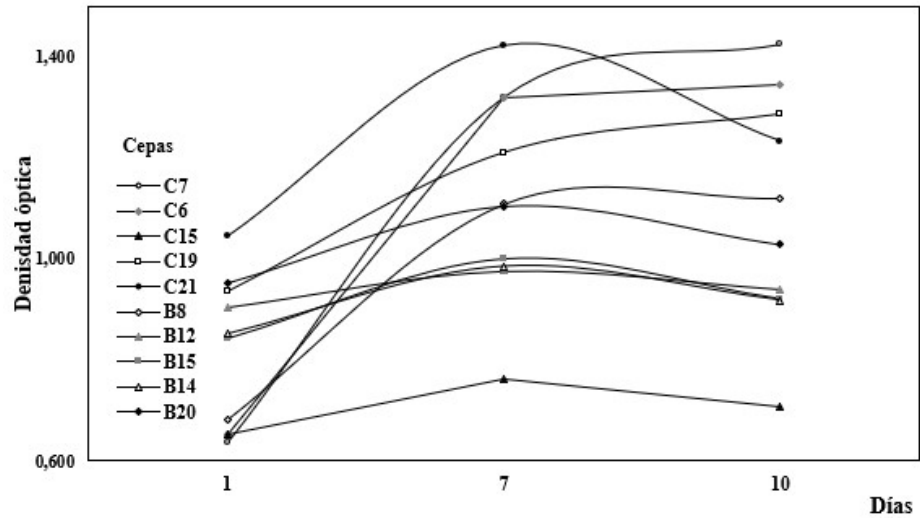


Figura 11. Cinética de crecimiento bacteriano después de 10 días de incubación en controles. Los puntos muestran la media de los datos.

4.2.6. pH, conductividad eléctrica y temperatura en estrés metálico

Los aislados bacterianos seleccionados tuvieron un aumento sustancial en el potencial de hidrógeno por parte de las bacterias B14, B12, B8 y C7, con un pH de 7.01 a 7.9 (Figura 12). Esto demuestra mayor incidencia en el crecimiento celular. Los análisis de conductividad eléctrica evidenciaron resultados propicios por parte de la bacteria aislada B14, que alcanzó mayor eficiencia en la capacidad de transmisión de la corriente eléctrica en el agua y su relación con la concentración de sales disueltas (Figura 13). Se determinó la temperatura óptima de crecimiento para todos los aislados bacterianos sometidos a este ensayo, y se indica que la cepa B12 obtuvo una temperatura óptima de crecimiento a los 25 °C el décimo día después de la inoculación (Figura 14).

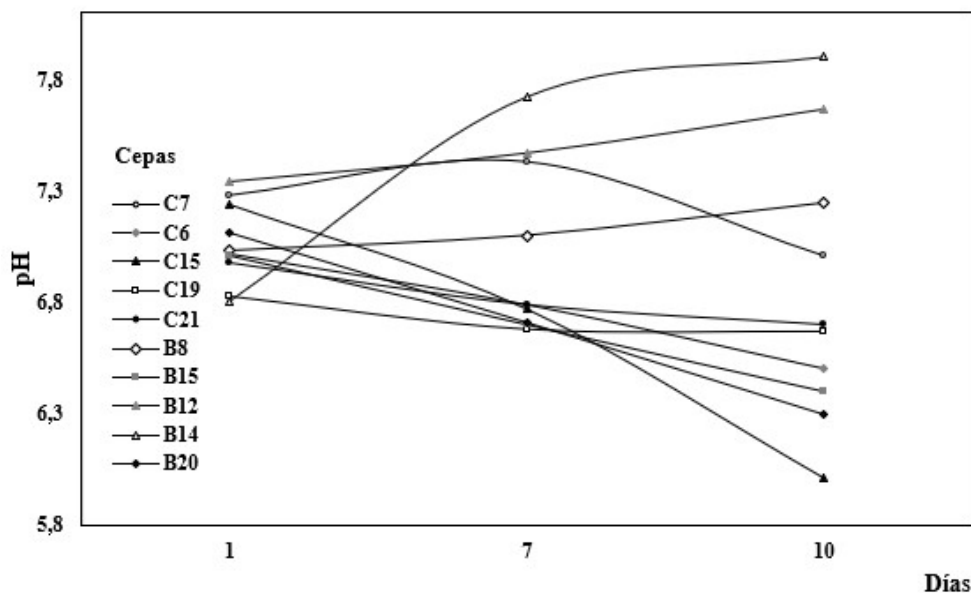


Figura 12. Comportamiento del potencial de hidrógeno en medios con cepas bacterianas bajo estrés metálico. Los puntos muestran la media de los datos.

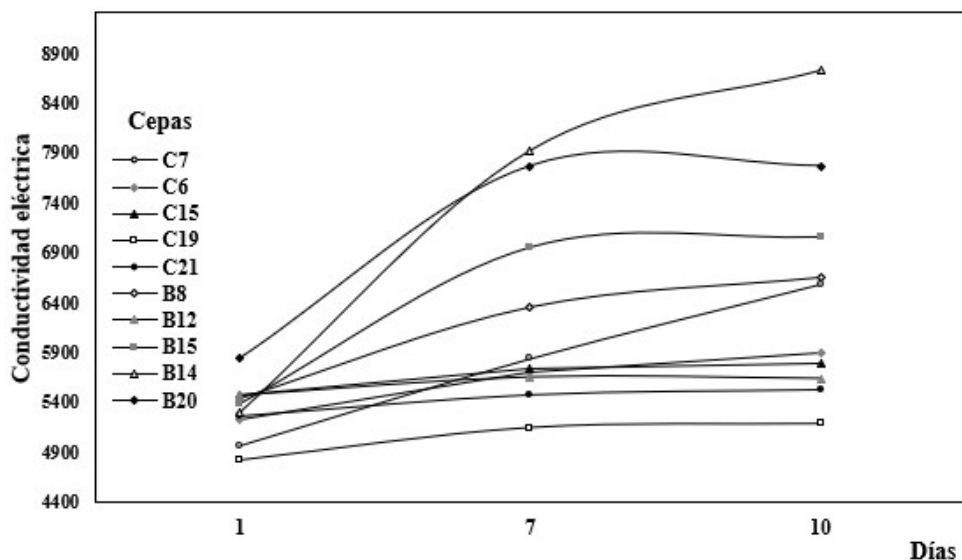


Figura 13. Conductividad eléctrica de las bacterias sometidas en estrés metálico. Los puntos muestran la media de los datos.

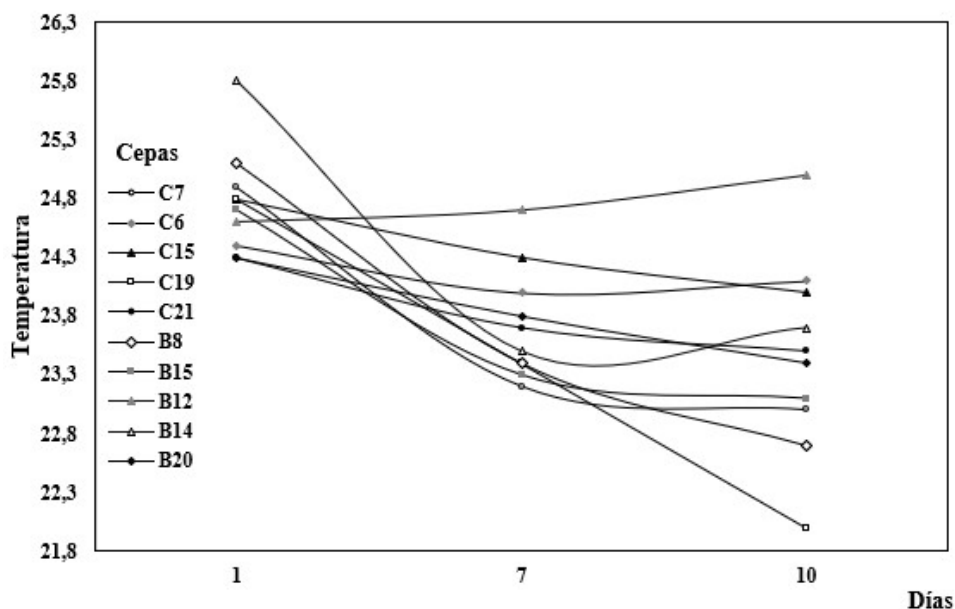


Figura 14. Comportamiento del crecimiento bacteriano ante variaciones de temperatura, bajo estrés metálico. Los puntos muestran la media de los datos.

4.2.7. pH, conductividad eléctrica y temperatura en controles

Los aislados bacterianos seleccionados para el control, obtuvieron un aumento sustancial en el pH específicamente por parte de las bacterias B14, B12, B20 y C21, con un pH de 7.01 a 7.09 (Figura 15), lo que evidencia la incidencia de en el crecimiento celular. Los análisis de conductividad eléctrica evidencian resultados propicios por parte de la cepa C6, que alcanzó mayor eficiencia en la capacidad de transmisión de la corriente eléctrica en el agua y su relación con la concentración de sales disueltas (Figura 16). Se determinó la temperatura óptima de crecimiento para todos los aislados bacterianos y predomina la cepa B8 con una temperatura superior a 26 C al décimo día después de la inoculación (Figura 17).

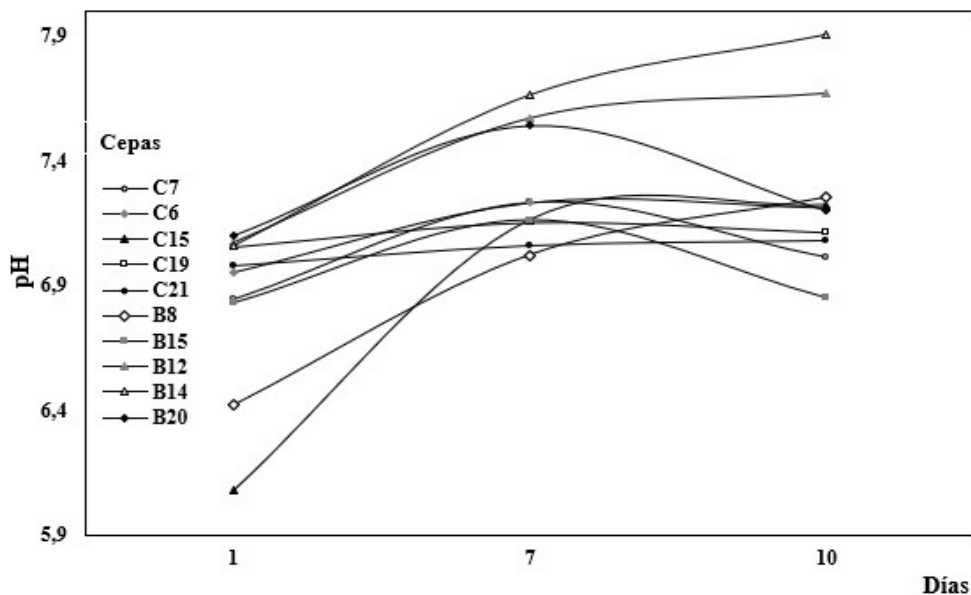


Figura 15. Comportamiento del potencial de hidrógeno en medios de control con cepas bacterianas. Los puntos muestran la media de los datos.

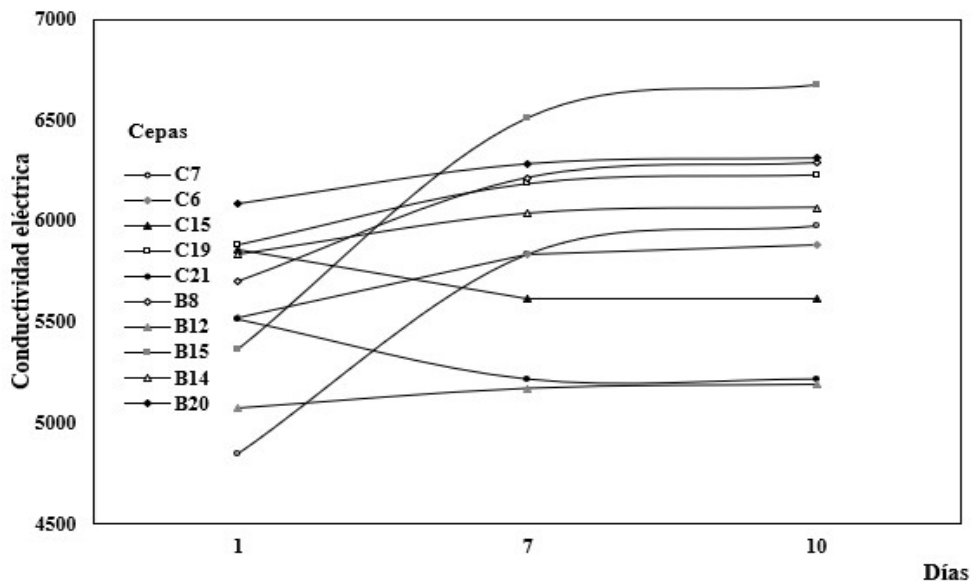


Figura 16. Conductividad eléctrica de las bacterias en medios de control. Los puntos muestran la media de los datos.

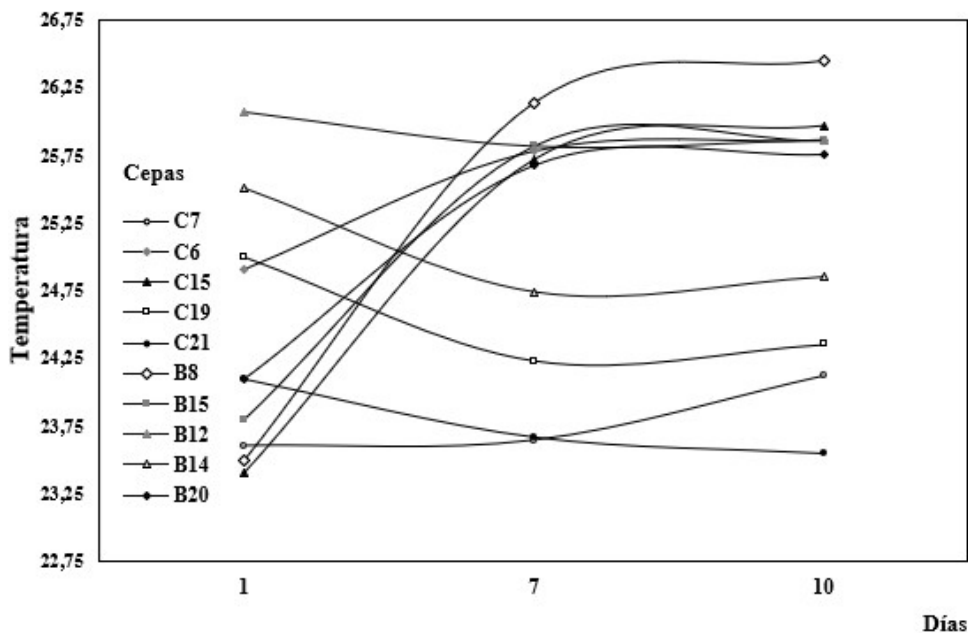


Figura 17. Comportamiento del crecimiento bacteriano ante variaciones de temperatura, en medios de control. Los puntos muestran la media de los datos.

4.2.8. Biomasa celular en estrés metálico y control

El mayor contenido de biomasa celular obtenido en condiciones de estrés metálico en cadmio a 6ppm, a los 10 días después de incubación, fue en la cepa bacteriana B8, que fue significativamente superior con 0.077 g a la cepa B12 (incremento celular de 0.068 g).

Además, superó a los demás tratamientos en estudio que alcanzaron una biomasa menor, con rangos entre 0.061 a 0.043 g (Figura 18). En cuanto a los contenidos de biomasa celular en los controles, la cepa bacteriana B14 fue estadísticamente superior con 0,110 g, seguido de B12 (0,107 g) y C21, B8 y C6 con 0,101 g. Los demás tratamientos fueron inferiores con rangos desde 0,090 a 0,080 g.

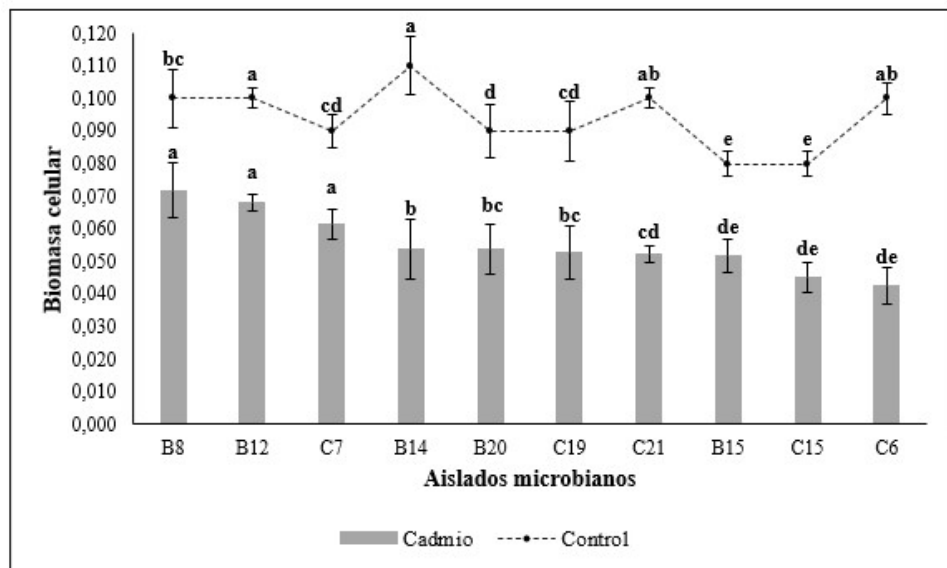


Figura 18. Relación de biomasa celular de las bacterias en cadmio y control. Las barras y los puntos denotan la media y la línea vertical muestra el error estándar. Letras diferentes denotan significancia estadística con la prueba de Tukey (*a posteriori*).

4.3. Determinación *in vitro* de la interacción entre los microorganismos seleccionados para establecer potenciales consorcios microbianos

En los estudios de interacción de cultivos a partir de las cepas seleccionadas, según la adaptación en ensayos con hidrocarburo y cadmio, fueron evaluadas mediante el estriado en cajas por separado y la mezcla de ambas. Los resultados del experimento se presentan en la Figura 19. En todas las placas se reflejó la inexistencia de inhibición a partir del crecimiento central donde se cruzaron las cepas seleccionadas de los ensayos de hidrocarburos, seguido de los ensayos de cadmio y por último la mix del conjunto de ambos ensayos. Se descarta la acción antagónica entre las cepas.

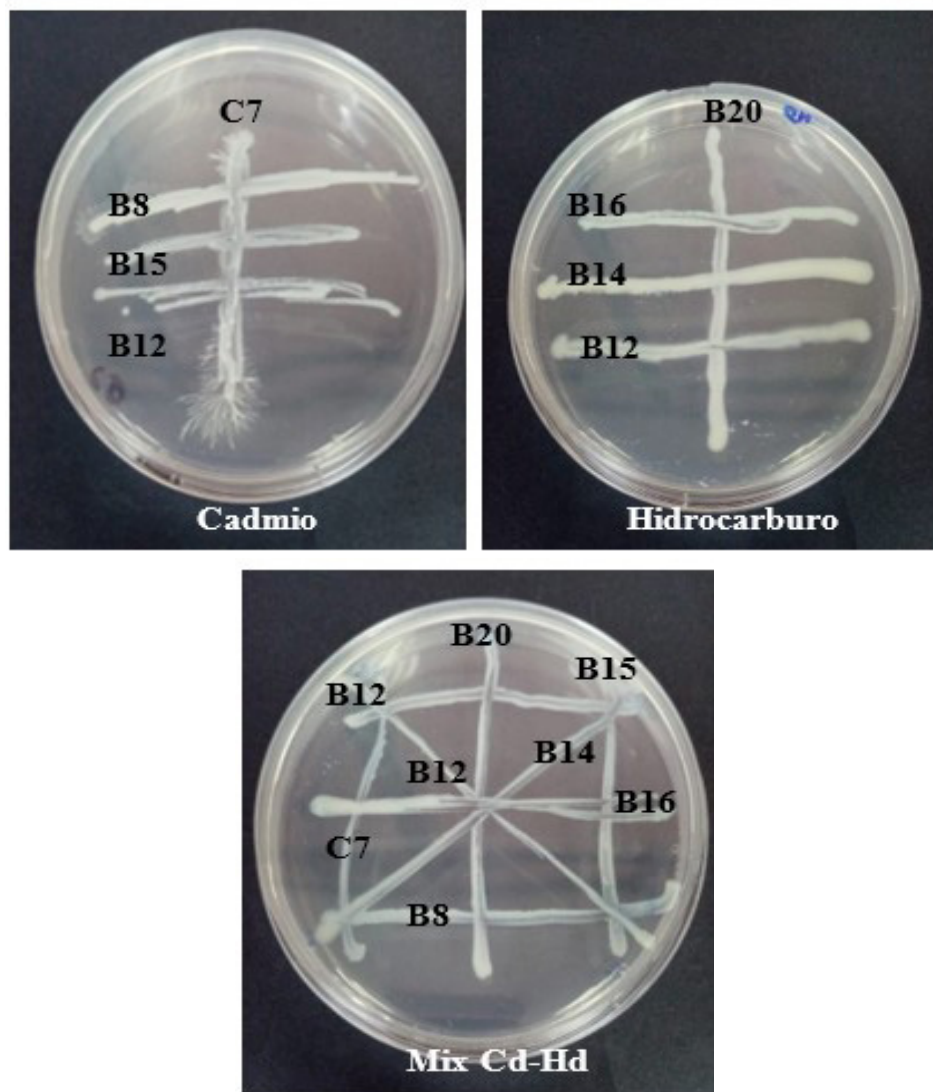


Figura 19. Ensayos de interacción entre bacterias resistentes a cadmio, diésel y mezcla de ambos, aisladas de muestras de suelo contaminado en la provincia Sucumbíos, Ecuador.

4.4. Discusión

El uso de los microorganismos para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y cadmio es un tema que gana relevancia a nivel mundial, en especial cuando se explora las zonas contaminadas. Según Korkeala y Sankari (1980), la catalasa es un proceso bioquímico donde la bacteria rompe las uniones de H_2O_2 y las convierte en molécula de Agua + Oxígeno, esto debido a que la enzima interviene como catalizador.

Dentro del estudio, los aislados bacterianos tienen un porcentaje mayor al 75% de actividad catalítica. Según los estudios de McLeod y Gordon (1922) y Gamzaeva (2021), estos autores indican que las bacterias tienen esta capacidad porque con la liberación de catalasa desprende el oxígeno que está oxidado, reduciendo los problemas de oxidación causados por fungicidas, metales pesados, bacterias productoras de H_2O_2 y suelos saturados con hidrocarburos con altos contenidos de H_2O_2 (Suganthi *et al.*, 2018).

La Tinción Gram es un proceso que nos permite diferenciar las bacterias Gram (+) y Gram (-). Los aislados bacterianos del presente estudio presentaron valores superiores al 60 % de bacterias gram (-) de los suelos contaminados con hidrocarburos y cadmio. Esto nos permite diferenciar el metabolismo del microorganismo. Richter *et al.* (2012) en uno de sus estudios manifiestan que los procesos de las bacterias gram (+) están relacionados a la anaerobiosis donde los procesos respiratorios se componen de aceptar electrones de Fe, S y Mn como fuente para realizar su metabolismo y obtener energía. Zhang *et al.* (2020) y Behera *et al.* (2021) manifiestan que las bacterias gram (-) toman como fuente de respiración el oxígeno

disponible en la solución de suelo, esto ayuda al incremento de procesos metabólicos, en especial la retención de metales pesados y la descomposición de compuestos aromáticos como los hidrocarburos en moléculas más sencillas.

La ureasa es una enzima muy importante en el suelo, esta ayuda a incrementar la eficiencia del nitrógeno en un 70% para suministrar a los cultivos y reducir los impactos ambientales a los acuíferos.

En nuestro estudio, cerca del 20 % de las bacterias entre gram (+) y (-) tienen la capacidad de liberar la enzima. En el estudio realizado con la metodología de Christensen (1946), según Callahan *et al.* (2005) y Abioye *et al.* (2019), la bacteria al liberar esta enzima incrementa el pH y precipita los metales pesados en especial el cadmio, esto debido a que se forma el gas amoníaco + CO₂. Esta reacción incrementa el contenido de OH, llevando la mayoría de componentes metálicos superiores a 5mg/kg - 1 a la precipitación.

También la enzima ureasa interviene en los procesos de degradación de hidrocarburos, sin embargo, para este proceso es eficiente aplicar fuentes nitrogenadas para reducir los contenidos de butanol, propanol y metanol. Según Volke-Sepulveda *et al.* (2006), para la descomposición de hidrocarburos, el contenido C/N debe estar entre 15/1. Esto incrementa el proceso de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos, la fuente de nitrógeno incrementa la población bacteriana y descompone los diferentes componentes en moléculas muy simples de C, H, O.

La tolerancia a metales pesados es un buen indicativo para tomar medidas biorremediadoras en un suelo. En el presente trabajo investigativo se seleccionaron los microorganismos que mayor

reacción tuvieron a las pruebas bioquímicas. Cerca del 60% de los microorganismos Gram (-) tuvieron tolerancia al cadmio, al pasar los días dos cepas (C7 y B8) de bacterias mantuvieron su crecimiento con valores D.O. entre 0.8 a 1.9 durante los días 1, 7 y 10 respectivamente.

En un estudio realizado por Zhou *et al.* (2020), determinaron que el contenido a 6 ppm incrementaba la producción de ácidos orgánicos, biomasa celular y carbonatos, mineralizando el contenido de cadmio disponible en el suelo. Las hipótesis de biomineralización y bioclimatización como procesos geoquímicos implicados en el ciclo del cadmio han sido respaldadas por modelos informáticos como GEOCHEM (Sposito, 1983; Mugwar y Harbottle, 2016), que han demostrado que en condiciones oxidantes fuertes, el cadmio puede formar óxidos y minerales de carbonato (es decir, CdO y CdCO₃ secundario). Asimismo, en condiciones reductoras también puede utilizar H₂S producido por bacterias durante la descomposición y precipitación de residuos orgánicos como sulfuro de Cd (Mislin y Ravera, 1986).

El pH, la conductividad eléctrica y la temperatura son parámetros que están relacionados a la precipitación del cadmio, en especial porque son procesos geoquímicos que suceden en el suelo. Las cepas bacterianas B12 y C10 incrementaron el pH con valores superiores a 7.5 durante el día 10, esto concuerda con Welch y Norvell (1999) donde el pH de la solución del suelo influye en la tasa de difusión del Cd soluble, principalmente debido al fuerte efecto que tiene el pH sobre la solubilidad del Cd en el suelo. A medida que el pH aumenta, el contenido de sólidos totales incrementa, precipitando los metales pesados. Según Chaali *et*

al. (2020), la temperatura es un indicativo de transformación de componentes. Dentro del estudio, las cepas B12 y C6 con valores de 24,0 y 25,0 °C obtuvieron el crecimiento óptimo. Según Prapagdee et al. (2013), la temperatura incrementa el metabolismo liberando enzimas como el oxalato que reduce los niveles disponibles de cadmio en el suelo.

La conductividad eléctrica es un indicativo de la actividad energética que generan los microorganismos en el suelo a partir de componentes inorgánicos. Las cepas B14 y C21 obtuvieron mayor conductividad eléctrica con valores de 7000 a 8500 uS. Li *et al.* (2020), manifiestan que las bacterias tienen mayor desprendimiento de cargas negativas liberados extracelularmente, esto permite mayor concentración de sólidos totales precipitados.

Según Moreno (2017), el potencial de interacciones sinérgicas o antagónicas se encuentran estrechamente relacionadas. La identificación de ambas interacciones es generalmente sencilla cuando ambas se evalúan bajo las mismas condiciones, donde obtener un favorecimiento sinérgico se representa en dirección contraria o inversa del antagónico y viceversa (Piggott et al., 2015). En el estriado se reflejó la inexistencia de inhibición a partir del crecimiento central, en cepas con resistencia a cadmio, diésel y la mezcla de todas. En un estudio realizado por Ethica et al. (2019), las colonias con rayas cruzadas se examinaron todos los días para determinar la presencia de zonas inhibitorias, y todos los aislamientos presuntamente fueron sinérgicos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La felicidad aparece cuando lo que piensas, lo que dices y lo que haces se encuentran en total armonía.

Mahatma Gandhi

5.1. Conclusiones

- Se aislaron 45 cepas bacterianas de 4 muestras pertenecientes a suelos de la parroquia Pucayacu , de los sectores Chone 1 y 2, considerando su ubicación con una diferencia menor a 1 km entre sí. Se seleccionaron 16 cepas, mismas que presentaron rasgos de importancia en la identificación de la enzima catalasa, gram negativas y positivas, resistencia de antibióticos con amplio espectro, solubilización de urea y crecimiento en gasoil como única fuente de carbono. Según su morfología, la mayor parte de cepas aisladas según su forma fueron circulares, por su elevación fueron planas y por su borde enteras.
- Las cepas C7 y B8 tuvieron un mejor crecimiento celular en concentraciones de 6 ppm de nitrato de cadmio, las cepas B12 y C10 alcanzaron un pH superior a 7,5. En cuanto la conductividad eléctrica, la cepa B12 tuvo mejores resultados y en la biomasa celular se obtuvo un mayor valor en las cepas B8 y B12 superiores a 0,077 g.
- Las cepas sometidas a ensayos con diésel, obtuvieron una respuesta favorable en cuanto a su crecimiento celular siendo la B12, B16 y C17 destacadas con valores de densidad óptica entre 1,70 y 1,60. Con respecto al recuento poblacional se estableció la relación entre control y con diésel, donde las cepas C10 y C17 obtuvieron valores de $1,65 \times 10^{10}$ UFC/ml y $1,60 \times 10^{10}$ UFC/ml respectivamente, mientras que en diésel la cepa B20 $2,5 \times 10^{10}$ UFC/ml. En el contenido de biomasa celular, la cepa B14 destacó con un valor superior a 0,130 g.
- Mediante el estudio de compatibilidad de cultivos se determinó que las cepas seleccionadas por su resistencia en medios contaminados con diésel y cadmio no reflejan inhibición a partir del crecimiento central de las cepas C20 y C7 respectivamente. La evaluación del crecimiento en la mezcla de todas las cepas C7, B8, B15, B12, B20, B16 y B14 no encontró inhibición, lo que podría sugerir un sinergismo entre las cepas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abioye, O. P., Aina, P. F., Ijah, J. U., y Aransiola, A. S. (2019). Effects of cadmium and lead on the biodegradation of diesel-contaminated soil. *Journal of Taibah University for Science*, 13(1), 628-638.
- Ahmad, M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., y Ok, Y. S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. *Chemosphere*, 99, 19-33.
- Apaza, A. (2020). «Aislamiento e identificación de microorganismos de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo de la ciudad de Juliaca». *Revista Científica de Investigaciones Ambientales*, 46-54.
- Appelbaum, P. C., Scragg, J. N., Bowen, A., Bhamjee, A., Hallett, A. F., y Cooper, R. (1977). *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *The Lancet*, 310(8046), 995-997.
- Barreto Franco, J. M., & Reyna Gaspar, M. M. (2020). Revisión bibliográfica del uso de tecnologías de remediación para suelos contaminados por hidrocarburos.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 426-493.
- Behera, H. T., Mojumdar, A., y Ray, L. (2021). Biology, genetic aspects and oxidative stress response of actinobacteria and strategies for bioremediation of toxic metals. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 181-192). Elsevier.
- Beldarraín, T., González, A., y Kala, D. (2017). Métodos de identificación de cepas productoras de ácido láctico aisladas a partir de matrices alimentarias. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 21(1).

- Beltrán, M., y Gómez, A. (2016). «Biorremediación de metales pesados cadmio (cd), cromo (cr) y mercurio (hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión». Revista Facultad de Ciencias Básicas 12(2):174-75. doi: 10.18359/rfcb.2027.
- Blanco, A., Ortega, L., Dueñas, J., Batista, R., Serafín, R., Autié, M. (2014). «Remoción de plomo (II) en vidrio volcánico y propuesta de absorbedor por etapas». Revista Iternacional 30(2):167-75.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., y Valdezate, S. (2011). «Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología». Enfermedades Infecciosas y Micrbiología Clínica 29(8). doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012.
- Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., y Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. Journal of applied microbiology, 124(5), 1175-1194.
- Brink, B. (2010). Urease test protocol. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Butrón, S. 2020. «Capacidad de biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad». Revista de Investigaciones de la Escuela de Posgrado 9(3):1671-84. doi: <http://dx.doi.org/10.26788/riepg.2020.3.182>.
- Callahan, B. P., Yuan, Y., & Wolfenden, R. (2005). The burden borne by urease. Journal of the American Chemical Society, 127(31), 10828-10829.
- Castañeda Matute, V. C. (2019). Evaluación in vitro de la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.) frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70693 (Bachelor's thesis).

-Castillo, R., More, F., Cornejo, M., Fernandez, J., y Mialhe, E. (2020). «Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui – Amazonas – Perú». *Rev. Investig. Altoandin.* 22(3):215-25.

-Castro, C. (2018). *Tabla Munsell Teoría y Práctica y Manejo de Tabla de colores Munsell y régimen de Humedad.*

-Chaali, N., Bravo, D., Ouazaa, S., Isidro Beltrán Medina, J., y Benavides, J. (2020). Predicting spatial distribution of heavy metals in agricultural soils using electrical resistivity tomography technique 2D-ERT. In EGU General Assembly Conference Abstracts (p. 5923).

-Christensen, W. B. (1946). Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *Journal of bacteriology*, 52(4), 461-466.

-Constitución de la República del Ecuador, (2008). 18-28 https://www.oas.org/juridico/pdfs/mesicic4_ecu_const.pdf

-Covarrubias, S., García, J., y Peña, J. (2015). «El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados». *Acta Universitaria* 25(3). doi: 10.15174/au2015.907.

-Escalante, A. E. (2007). *Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas.* *Ecología Molecular*; Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México. DF. pp, 393-424.

-Ethica, S. N., Muslim, R., Widyawardhana, R. B. I., Firmansyah, A., & Imam, S. (2019). Synergism and antagonism among indigenous hydrolytic bacteria from biomedical wastes for the generation of bacterial consortium used as bioremediation agent. *International Journal of Environmental Science and Development*, 10(12).

Farazmand, S., Ehsani, M. R., Shadman, M. M., Ahmadi, S., Veisi, -S., y Abdi, E. (2016). The effects of additives on the reduction of the pour point of diesel fuel and fuel oil. *Petroleum Science and Technology*, 34(17-18), 1542–1549. doi:10.1080/10916466.2016.1200082

-Feng, J., Wang, B., Zhang, D., Chu, S., Zhi, Y., Hayat, K., ... y Zhou, P. (2021). *Streptomyces griseorubens* JSD-1 promotes rice straw composting efficiency in industrial-scale fermenter: Evaluation of change in physicochemical properties and microbial community. *Bioresource Technology*, 321, 124465.

-Fernández Linares, L. C. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados (No. Sirsi) i9684890397).

-Fernandez, A, Garcia, C., Saéz, J., y Valdezate, S. (2010). «Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología». en *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Seimc*.

-Food and Agriculture Organization, FAO. (2018). «SEA la solución a la contaminación del suelo». en Documento final del simposio mundial sobre la contaminación del suelo. Roma, Italia.

-Food and Agriculture Organization, FAO. (2021). Estado del conocimiento sobre la biodiversidad del suelo. Situación, desafíos y potencialidades. Resumen para los formuladores de politica. ROMA.

-Gamzaeva, R. S. (2021, March). Influence of oil pollution on the surface of the microbial community and catalase activity of sod-podzolic soil. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 723, No. 5, p. 052023). IOP Publishing.

- Gobernado, M., y López, J. (2003). «Identificación bacteriana». *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 21(2):54-60.
- Gram, C. (1884). Ueber die isolirte Farbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.
- Hemmat-Jou, M. H., Safari-Sinegani, A. A., Mirzaie-Asl, A., y Tahmourespour, A. (2018). Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*. doi:10.1007/s10646-018-1981-x
- Hong, J. H., Kim, J., Choi, O. K., Cho, K.-S., y Ryu, H. W. (2005). Characterization of a diesel-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* IU5, isolated from oil-contaminated soil in Korea. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 381–384. doi:10.1007/s11274-004-3630-1
- Jiménez, R. (2017). Introducción a la contaminación de suelos. Vol. 31. 3.a ed. Madrid, España: Mundi Presa.
- Korkeala, H., & Sankari, S. (1980). The effect of catalase on the toxicity of cadmium in cadmium-sensitive and cadmium-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 21(2), 209-223.
- Li, J. Y., Li, Y. H., Qi, M. Y., Lin, Q., Tang, Z. R., y Xu, Y. J. (2020). Selective organic transformations over cadmium sulfide-based photocatalysts. *ACS Catalysis*, 10(11), 6262-6280.
- MacFaddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la Identificación de bacterias de Importancia Clínica. 3era Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina.
- Manzi, L. V., y Mayz, J. C. (2003). Valorando los microorganismos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1), 85-88.

-Martínez, M., y Soto, C. (2017). «Remoción de hidrocarburos de petróleo de un suelo de baja». *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 16(3):955-70.

-McLeod, J. W., y Gordon, J. (1922). Production of hydrogen peroxide by bacteria. *Biochemical Journal*, 16(4), 499.

-Miles, A. A., Misra, S. S., y Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749.

-Ministerio del Ambiente. (2015a). 097-A Refórmese el Texto Unificado de Legislación Secundaria. No 387. Recuperado a partir de https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015_0.pdf

-Ministerio del Ambiente. (2015b, mayo 4). Acuerdo 061. Reforma del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria. No 449. Recuperado a partir de <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu155124.pdf>

-Mislin, H, and Ravera, O. Cadmium in the environment. Germany: N. p., 1986.

Morales-García, y. E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre, J., Martínez-Contreras, R. D., Pérez-Terrón, R., & Muñoz Rojas, J. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*, 14(2), 11-29.

-Morante, L., Canchignia, H., Morante, J., Romero, R., Cedeño, A., y Abasolo, F. (2019). Bacterias con potencialidades para la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados de Quevedo, Ecuador / Bacteria with potential for hydrocarbons degrading in contaminated soils in Quevedo, Ecuador. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 8 pp, dec. 2019. ISSN 2307-695X. Disponible en: <<http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/257/322>>. Fecha de acceso: 11 dec. 2021

-Moreno Riaño, C. P. (2017). Evaluación del antagonismo y sinergismo en aislados microbianos obtenidos de *Plukenetia volubilis* L para la conformación de un consorcio microbiano en condiciones in vitro.

-Moreno, J., y Albarracín, V. (2012). «Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales». *Reduca (Biología)* 5(5):79-93.

-Mugwar, A. J., y Harbottle, M. J. (2016). Toxicity effects on metal sequestration by microbially-induced carbonate precipitation. *Journal of hazardous materials*, 314, 237-248.

-Munsell Color. 2000. Munsell® Soil Color Charts. Year 2000 Revised Washable Edition. Grand Rapids. MI.

-Nath, S., Deb, B., y Sharma, I. (2018). Isolation of toxic metal-tolerant bacteria from soil and examination of their bioaugmentation potentiality by pot studies in cadmium- and lead-contaminated soil. *International Microbiology*, 21(1-2), 35–45. doi:10.1007/s10123-018-0003-4

-Noellemeyer, E., Quiroga, A. R., Fernandez, R., Frasier, I., Alvarez, C., Álvarez, L., y Gómez, F. (2021). Guía para la evaluación visual de la calidad del suelo. Cátedra de Edafología y Manejo de Suelos, Universidad Nacional de La Pampa.

-Ordoñez, D., Abella C., Echeverry, A., y Paz, L. (2018). «Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo». *Revista de Ciencias* 22(2):33-44. doi: 10.25100/rc.v22i2.7917.

-Osorio, N. (2012). Toma de muestras de suelos para evaluar la fertilidad del suelo. *Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal* 1(1): 1-4.

-Otero, R., Peralta, T., y Ordinola, A. (2021). «Caracterización de cepas de *Vibrio* spp. biorremediadoras de petróleo aisladas de agua marina.» *Manglar* 18(1):21-22. doi: <http://dx.doi.org/10.17268/manglar.2021.003>.

-Piggott, J. J., Townsend, C. R., & Matthaei, C. D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecology and evolution*, 5(7), 1538-1547.

-Pírez, M., y Mota, M. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica: morfología y Estructura Bacteriana*. Universidad de la República Montevideo.

-Prapagdee, B., Chanprasert, M., y Mongkolsuk, S. (2013). Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 92(6), 659-666.

-Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., y Naidu, R. (2018). Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Science of The Total Environment*, 636, 968–974. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.3

-Ramírez, A. (2002). «Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos». *Anales de la Facultad de Medicina* 63(1):51-64.

-Richter, K., Schicklberger, M., & Gescher, J. (2012). Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Applied and environmental microbiology*, 78(4), 913-921.

-Rodríguez, A., Cuéllar, L., Maldonado, G., y Suardiaz, M., (2016). «Efectos nocivos del plomo para la salud del hombre». *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*.

-Rodríguez, D. T. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*, 12(2).

-Rodríguez, N., McLaughlin M., y Pennock, D. (2019). *La contaminación del suelo una realidad oculta*. ROMA: FAO.

-Ruiz, G. D., y Rodarte, C. W. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoamer. Microbiol*, 45(1-2), 30-40.

-Sánchez, M., González T., Ayora T., Zahaed M., y Pacheco N. (2017). «¿Qué son los microbios?» *Ciencia*, 10-17.

-Santana, A., Sánchez A., Romero Y., Toledo E., Santo O., y Toribio J. (2020). «Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados, obtenidas de los jales mineros El Fraile, México Identification and isolation of heavy-metal tolerant and bioaccumulator bacteria obtained from El Fraile mine tailings, Mexico». *Terra Latinoamericana* 38:67-75. doi: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.430>.

-Scovino, J. S., & Rowell, D. L. (1988). The use of feldspars as potassium fertilizers in the savannah of Colombia. *Fertilizer research*, 17(1), 71-83.

-Sharpe, A. N., & Kilsby, D. C. (1971). A rapid, inexpensive bacterial count technique using agar droplets. *Journal of Applied Bacteriology*, 34(2), 435-440.

-Sposito, G. (1983). On the surface complexation model of the oxide-aqueous solution interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 91(2), 329-340.

-Stefani, F. O., Bell, T. H., Marchand, C., de la Providencia, I. E., El Yassimi, A., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2015). Culture-dependent and-independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. *PloS one*, 10(6), e0128272.

-Suganthi, S. H., Murshid, S., Sriram, S., & Ramani, K. (2018). Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants. *Journal of environmental management*, 220, 87-95.

- Sutherland, R., & Rolinson, G. N. (1964). Characteristics of methicillin-resistant staphylococci. *Journal of bacteriology*, 87(4), 887-899.
- Vargas, T., y Kuno, A. (2014). «Morfología bacteriana». *Revista de Actualización Clínica* 49(2):2594-98.
- Varjani, S. (2017). «Microbial degradation of petroleum hydrocarbons». *Bioresource Technology* 203:277-86. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.
- Vizuite, R., Pascual A., Taco C., y Morales A. (2020). «Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a base de bacterias utilizadas como bioproductos». *Revista Lasallista de investigación* 17(1). doi: 10.22507/rli.v17n1a19.
- Volke-Sepulveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (2006). Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology*, 97(14), 1583-1591.
- Welch, R. M., & Norvell, W. A. (1999). Mechanisms of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. In *Cadmium in soils and plants* (pp. 125-150). Springer, Dordrecht.
- Xie, Y., He, N., Wei, M., Wen, T., Wang, X., Liu, H., ... & Xu, H. (2021). Cadmium biosorption and mechanism investigation using a novel *Bacillus subtilis* KC6 isolated from pyrite mine. *Journal of Cleaner Production*, 127749.
- Zeng, W., Li, F., Wu, C., Yu, R., Wu, X., Shen, L., Li, J. (2019). Role of extracellular polymeric substance (EPS) in toxicity response of soil bacteria *Bacillus* sp. S3 to multiple heavy metals. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. doi:10.1007/s00449-019-02213-7
- Zhang, Y., Zou, J., Meng, D., Dang, S., Zhou, J., Osborne, B., ... & Yu, K. (2020). Effect of soil microorganisms and labile C availability on soil respiration in response to litter inputs in forest ecosystems: A meta analysis. *Ecology and evolution*, 10(24), 13602-13612.

-Zhou, Q., Liu, Y., Li, T., Zhao, H., Alessi, D. S., Liu, W., y Konhauser, K. O. (2020). Cadmium adsorption to clay-microbe aggregates: Implications for marine heavy metals cycling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 290, 124-136.

-Zhu, Y., Xu, F., Liu, Q., Chen, M., Liu, X., Wang, Y., y Zhang, L. (2019). Nanomaterials and plants: Positive effects, toxicity and the remediation of metal and metalloid pollution in soil. *Science of The Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.234

FERNANDO ABASOLO PACHECO



Biólogo graduado en la Universidad Autónoma de Puebla, Maestría y Doctorado en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. Línea de trabajo orientada al uso de alternativas eficientes y ecológicas para disminuir el uso de sustancias químicas tóxicas en acuicultura y agronomía. Ha desarrollado trabajos relacionados con la selección y caracterización in vitro de microorganismos con potencial probiótico en acuicultura y el uso de homeopatía en acuicultura y agricultura, con la finalidad de optimizar los recursos animales y vegetales. Ha participado y dirigido proyectos científicos tecnológicos CONACyT-ProInnova, SEP-CONACyT en México y FOCICYT en Ecuador. Es co-inventor de tres patentes relacionadas con el uso de la homeopatía en acuicultura y agricultura. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI), con distinción como investigador Nivel 1, en México. Actualmente es docente de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UTEQ, en Ecuador.

Joselyn Roxanna Vilela Sabando



Titulada de Ingeniera en Gestión Ambiental y Magíster en Gestión Ambiental en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Su formación se ha complementado mediante la participación en programas como: La Educación Ambiental Tierra de Todos, Conversatorio sobre “El Cambio Climático, el Crecimiento Económico y la Agricultura”, Seminario Nacional Socio Ambiental: Perspectivas y análisis sobre la Gestión Ambiental, Forestal y Turística del Ecuador, Cumbre Internacional del Medio Ambiente (CIMA). Su experiencia profesional se ha centrado en el campo de la educación e investigación. Además, ha logrado participar en la capacitación de diseños industriales y desarrollo de productos y como técnica ambiental en diversas actividades que promueven un cambio en el cuidado del medio ambiente.



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: 978-9978-371-35-0



9 789978 371350

