

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“EVALUACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES A METALES PESADOS EN LA ZONA DEL CANAL DE RIEGO LATACUNGA-SALCEDO-AMBATO CON POTENCIAL BIORREMEDIADOR”**

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO.**

**AUTOR: DANIEL PATRICIO REINOSO TORRES**

**TUTORA: Ing. Mg. ELIZABETH IBARRA LÓPEZ**

**CEVALLOS-ECUADOR**

**2016**

## **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

“El suscrito Daniel Patricio Reinoso Torres, portador de cédula identidad número: 050350048-0, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EVALUACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES A METALES PESADOS EN LA ZONA DEL CANAL DE RIEGO LATACUNGA-SALCEDO-AMBATO CON POTENCIAL BIORREMEDIADOR” es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

-----  
Daniel Patricio Reinoso Torres

## **DERECHOS DE AUTOR**

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EVALUACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES A METALES PESADOS EN LA ZONA DEL CANAL DE RIEGO LATACUNGA-SALCEDO-AMBATO CON POTENCIAL BIORREMEDIADOR” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

-----  
Daniel Patricio Reinoso Torres

**“EVALUACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES A  
METALES PESADOS EN LA ZONA DEL CANAL DE RIEGO  
LATACUNGA-SALCEDO-AMBATO CON POTENCIAL  
BIORREMEDIADOR”**

**REVISADO POR:**

-----  
Ing. Mg. Elizabeth Ibarra López  
**TUTORA**

-----  
Ing. Mg. Wilfrido Yáñez  
**ASESOR DE BIOMETRÍA**

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE  
CALIFICACIÓN:**

-----  
Ing. Mg. Eduardo Cruz  
**PRESIDENTE**

-----  
Fecha

-----  
Ing. Mg. Alberto Gutiérrez

-----  
Fecha

-----  
Ing. Mg. Marco Pérez

-----  
Fecha

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y mis santos de devoción, por brindarme la fuerza, la sabiduría y la salud para lograr mi meta.

A mis padres y mi hermana por su esfuerzo, paciencia, dedicación y cariño.

A mi tutora del proyecto de investigación Ing. Mg. Elizabeth Ibarra, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A la facultad de Ciencias Agropecuarias de mi querida Universidad Técnica de Ambato.

## **DEDICATORIA**

Por sobre todo a mi madre Marlene, mi padre Patricio y mi hermana Lizeth ya que son las personas más importantes en mi vida.

A la memoria de mis abuelitos Victor y Finda, por apoyarme, aconsejarme y preocuparse en todo momento por mi.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
CAPÍTULO I -----	1
INTRODUCCIÓN -----	1
CAPÍTULO II -----	4
MARCO TEÓRICO -----	4
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS -----	4
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES -----	7
2.2.1 Bacteria-----	7
2.2.1.1. Cepa Bacteriana -----	8
2.2.1.2. Reproducción bacteriana-----	8
2.2.1.3. Crecimiento bacteriano-----	9
2.2.2. Tratamientos de agua para riego-----	9
2.2.2.1. Tratamiento Físico-químico -----	10
2.2.2.2. Tratamiento Biológico -----	10
2.2.2.2.1. Biorremediación-----	10
2.2.2.2.1.1. Tipos de Biorremediación-----	10
2.2.2.2.1.2. Degradación enzimática-----	11
2.2.2.2.1.3. Remediación microbiana-----	11
2.2.2.2.2. Fitorremediación -----	12
2.2.3. Metales Pesados-----	13
2.2.3.1. Cobre (Cu) -----	15
2.2.3.2. Cadmio (Cd) -----	16
2.2.3.3. Biodisponibilidad de metales pesados -----	16
2.2.3.4. Mecanismo de resistencia a metales-----	16
CAPÍTULO III -----	18
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS -----	18
3.1. HIPÓTESIS -----	18
3.2. OBJETIVOS -----	18
3.2.1. Objetivo General -----	18
3.2.2. Objetivos Específicos-----	18
CAPÍTULO IV -----	19

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN-----	19
4.1. UBICACIÓN DE EXPERIMENTO-----	19
4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR -----	19
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES -----	19
4.3.1. Material experimental-----	19
4.3.2. Equipos -----	19
4.3.3. Materiales-----	20
4.3.4. Reactivos -----	20
4.4. FACTOR DE ESTUDIO -----	20
4.4.1. Cepas bacterianas -----	20
4.4.2. Metales pesados -----	21
4.5. TRATAMIENTOS -----	21
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL -----	23
4.7. VARIABLE RESPUESTA -----	23
4.7.1. Análisis fisicoquímico de agua de riego-----	23
4.7.2. Caracterización macroscópica -----	23
4.7.3. Caracterización microscópica-----	23
4.7.4. Crecimiento bacteriano en placa-----	23
4.7.5. Absorbancia -----	23
4.8. MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN -----	24
4.8.1. Análisis de agua de riego -----	24
4.8.2. Selección de cepas bacterianas de estudio-----	24
4.8.3. Purificación y almacenamiento de las cepas bacterianas -----	24
4.8.4. Caracterización macroscópica de bacterias -----	25
4.8.5. Caracterización microscópica de bacterias-----	25
4.8.6. Ensayo de resistencia bacteriana a metales pesados -----	26
4.8.6.1. Concentración del metal -----	26
4.8.6.2. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio sólido ---	26
4.8.6.3. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio líquido --	27
4.9. Procesamiento de la información-----	28
CAPÍTULO V -----	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	29
5.1. Análisis y discusión de resultados -----	29
5.1.1. Resultados del análisis del agua de riego -----	29
5.1.2. Caracterización macroscópica de bacterias-----	31



5.1.3. Caracterización microscópica de bacterias -----	31
5.1.4. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio sólido-----	32
5.1.4.1. Crecimiento bacteriano-----	32
5.1.5. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio líquido-----	36
5.1.5.1. Absorbancia-----	36
5.2. Verificación de la hipótesis -----	40
CAPÍTULO VI-----	41
CONCLUSIONES BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS-----	41
6.1. CONCLUSIONES -----	41
6.2. BIBLIOGRAFÍA -----	42
6.3. ANEXOS -----	48
CAPÍTULO VII-----	57
PROPUESTA-----	57
7.1. DATOS INFORMATIVOS-----	57
7.1.1. Título -----	57
7.1.2. Institución ejecutora-----	57
7.1.3. Beneficiarios-----	57
7.1.4. Ubicación -----	57
7.1.5. Tiempo estimado para la ejecución -----	57
7.1.6. Equipo técnico responsable -----	58
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA -----	58
7.3. JUSTIFICACIÓN -----	58
7.4. OBJETIVO -----	59
7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD -----	59
7.6. FUNDAMENTACIÓN -----	59
7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO-----	60
7.7.1. Crecimiento de bacterias-----	60
7.7.2. Prueba de tinción de Gram -----	60
7.7.3. Resistencia de bacterias a Cu y Cd en medio sólido-----	60
7.7.4. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio líquido -----	61
7.8. ADMINISTRACIÓN -----	61
7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN-----	61

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
TABLA 1. PRINCIPALES ORIGENES ANTROPOGÉNICOS DE LOS METALES PESADOS .....	14
TABLA 2. CRITERIOS DE CALIDAD ADMISIBLES PARA AGUAS DE USO AGRÍCOLA EN RIEGO. ....	14
TABLA 3. TRATAMIENTOS .....	22
TABLA 4. PUNTOS DE MUESTREO PARA CEPAS BACTERIANAS. ....	24
TABLA 5. VALORACIÓN CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.....	27
TABLA 6. DISTRIBUCIÓN DE TUBOS MICROBIOLÓGICOS .....	27
TABLA 7. PARÁMETRO FÍSICOQUÍMICO DE LA MUESTRA DEL CANAL LATACUNGA-SALCEDO-AMBATO.....	29
TABLA 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	32
TABLA 9. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE CRECIMIENTO BACTERIANO .....	33
TABLA 10. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA CEPAS BACTERIANAS EN LA VARIABLE CRECIMIENTO BACTERIANO. ....	34
TABLA 11. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA METALES PESADOS EN LA VARIABLE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	34
TABLA 12. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE ABSORBANCIA (595 nm) .....	36
TABLA 13. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE ABSORBANCIA (595 nm).....	37
TABLA 14. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA CEPAS BACTERIANAS EN LA VARIABLE ABSORBANCIA (595 nm) .....	38
TABLA 15. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA METALES PESADOS EN LA VARIABLE ABSORBANCIA (595 nm) .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
<i>Figura 1.</i> Apariencia físicas generales de las bacterias.-----	8
<i>Figura 2.</i> Curva de crecimiento bacteriano -----	9
<i>Figura 3.</i> Diferentes modos de biorremediación -----	11
<i>Figura 4.</i> Metabolismo Microbiano-----	12
<i>Figura 5.</i> Morfología y crecimiento de las colonias -----	25
<i>Figura 6.</i> Interpretación de la tinción de Gram-----	26

## RESUMEN

El canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato es abastecido con el agua del río Cutuchi, el cual riega importantes áreas de cultivos de las provincias de Cotopaxi y Tungurahua. El vertimiento directo de aguas contaminadas al río por parte de curtiembres, industrias textiles, aguas servidas, mataderos, fábricas, hospitales y actividades agrícolas, hacen de este ecosistema, un espacio susceptible a la contaminación por metales pesados.

En este estudio se determinó la capacidad de resistencia de cepas bacterianas a metales pesados cobre y cadmio mediante la utilización de biomasa de bacterias previamente aisladas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato. Se escogieron al azar diez bacterias del banco de microorganismos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias las cuales se encuentran codificadas como BUTA1 a BUTA40 y se realizó la caracterización macroscópica y microscópica. La determinación de resistencia bacteriana fue analizada mediante el método de crecimiento bacteriano en medio sólido y medio líquido según Serrano, 2015. Las bacterias BUTA13, BUTA15, BUTA16 y BUTA19 presentaron un amplio rango de resistencia a la presencia de 2mM de Cu. En cuanto a las bacterias BUTA13, BUTA16 y BUTA19 presentaron un amplio rango de resistencia a la presencia de 2mM de Cd.

Con los resultados obtenidos se presentan cepas bacterianas, aisladas de una fuente de contaminación ambiental natural, con potencialidad en cuanto a la resistencia a metales pesados constituyéndose en bacterias aptas para ser aplicadas en procesos de biorremediación de ecosistemas contaminados con metales pesados como Cu y Cd.

**Palabras clave:** Resistencia, metales pesados, cepas bacterianas, biorremediación.

## ABSTRACT

The Latacunga-Salcedo-Ambato irrigation canal is supplied with water from the Cutuchi river, which irrigates important crop areas of the provinces of Cotopaxi and Tungurahua. The direct dumping of contaminated water to the river by tanneries, textile industries, sewage, slaughterhouses, factories, hospitals and agricultural activities, make this ecosystem a space susceptible to contamination by heavy metals.

This study determined the resistance capacity of bacterial strains to heavy metals copper and cadmium using biomass of bacteria previously isolated from the Latacunga-Salcedo-Ambato irrigation canal. Ten bacteria from the microorganism bank of the Faculty of Agricultural Sciences were chosen at random, which are coded as BUTA1 to BUTA40 and the macroscopic and microscopic characterization was performed. The determination of bacterial resistance was analyzed by the method of bacterial growth in solid medium and liquid medium according to Serrano, 2015. The bacteria BUTA13, BUTA15, BUTA16 and BUTA19 presented a wide range of resistance to the presence of 2mM of Cu. As for the bacteria BUTA13, BUTA16 and BUTA19 presented a wide range of resistance to the presence of 2mM of Cd.

The results obtained show bacterial strains isolated from a source of natural environmental contamination with potential for resistance to heavy metals constituting bacteria suitable for application in bioremediation processes of ecosystems contaminated with heavy metals such as Cu and Cd.

**Key words:** Resistance, heavy metals, bacterial strains, bioremediation.

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

La contaminación de ecosistemas naturales por metales pesados es una de las mayores preocupaciones ambientales en la actualidad, ya que representan una amenaza para el medio ambiente y la salud pública debido, principalmente, a su toxicidad, acumulación en la cadena alimentaria y persistencia en la naturaleza. En cierta medida, la presencia de este tipo de elementos tiene un origen natural: procesos de meteorización, incendios, erupciones volcánicas, transporte aéreo de partículas, etc., contribuyendo al incremento de metales pesados en diferentes nichos ecológicos. Sin embargo, son las actividades antropogénicas tales como la agricultura, la minería, el vertido de residuos por parte de diferentes industrias, las principales responsables de la acumulación en cantidades no deseables de una gran variedad de metales. Debido a las intensas actividades industriales y agropecuarias, el Canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato se convierte en un ecosistema muy susceptible a la contaminación por metales pesados, por lo cual se hace imprescindible la búsqueda de alternativas encaminadas a la remoción de esta contaminación. (Quinaluisa, 2016)

El uso de agua contaminada con productos químicos y biológicos siempre ha constituido la principal fuente para la producción de alimentos, se ha encontrado que la mayoría de los cuerpos de agua importantes están contaminados a diferentes niveles, no se disponen de datos actualizados sobre la contaminación de los recursos hídricos en el Ecuador. Esto ha permitido que la discusión sobre la contaminación del agua se base más en percepciones, o discursos, que en datos reales (Guadarrama y Galván, 2015).

La contaminación de ecosistemas acuáticos por metales pesados como: cobre y cadmio, para la agricultura, es un problema crítico actualmente, se origina por las actividades productivas del hombre o fuentes antropogénicas como son: la minería, producción de acero, curtido de pieles, centrales eléctricas, aplicación de plaguicidas, fertilizantes, desechos de industrias. Los elementos químicos al no ser biodegradables

constituyen una amenaza biológica, las bacterias que contienen sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales son capaces de sobrevivir en ecosistemas con concentraciones altas de metales (Marrero-Coto et al., 2009).

Los altos niveles de concentración de metales pesados en agua utilizada para riego representan un problema importante para la agricultura y la salud humana, ya que se acumulan en los tejidos vivos, en el Ecuador la contaminación de las fuentes de agua de riego es mayor debido al continuo vertimiento de aguas residuales a los ríos sin previo tratamiento, el abandono de los sistemas implementados y el crecimiento del sector urbano. Esto ha originado graves problemas ambientales y los efectos de la contaminación conllevan a la degradación de los recursos hídricos, a la disminución de la calidad de agua disponible para el riego de diversos cultivos agrícolas, y a la degradación del suelo. (Pozo, 2012)

Varios microorganismos son conocidos por ser capaces de concentrar especies de metales de soluciones acuosas diluidas y de almacenarlas dentro de su estructura celular. Estos microorganismos incluyen levaduras, hongos, algas y bacterias, en su mayoría se utilizan bacterias, que pueden movilizar o inmovilizar metales, metaloides a partir de procesos de oxidación y reducción. (Panigatti et al., 2012)

El conocimiento de la diversidad microbiana en ecosistemas contaminados es de gran importancia y utilidad para determinar poblaciones de bacterias que al estar en contacto con los contaminantes tales como metales pesados, desarrollan mecanismos para contrarrestar los efectos tóxicos. La información y los resultados obtenidos permiten usar la microbiota autóctona del agua contaminada en prácticas de biorremediación (Arrieta et al., 2012).

Muchos compuestos tóxicos son difíciles de degradar por la falta de microorganismos que reconozcan y transformen estos compuestos, es por ello que se ha identificado bacterias aerobias reconocidas por sus habilidades degradativas. Entre ellas se encuentran *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomona*, entre otras, muchas bacterias usan los contaminantes como única fuente de carbono y energía. (Di Paola y Vicién, 2010)

Una publicación del diario El Telégrafo de septiembre del (2010), manifiesta que el río Cutuchi del cual se toma sus aguas para el sistema de riego Latacunga-Salcedo-Ambato, se encuentra contaminado; Jorge Jurado secretario nacional de Senagua y Jackeline Arroyo, asesora en calidad del agua quien realizó la investigación en el año 2009 y 2010 encontraron contaminantes biológicos, patógenos y elementos tóxicos que sobrepasan la norma ambiental vigente, tales como cadmio, cromo, manganeso, selenio y arsénico que está contaminando a unas 17.000 familias que usan el agua en 8.000 ha de cultivos en las Provincias de Cotopaxi y el Norte de Tungurahua.

Con la presente investigación se pretende, evaluar y seleccionar cepas bacterianas previamente aisladas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato, con potencial para ser utilizadas en biorremediación de aguas de riego contaminadas con metales pesados (Islas y Bojórquez, 2011).



## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

El uso de las aguas residuales en riego es tan antiguo como la misma agricultura. Sin embargo, su aprovechamiento a gran escala data del siglo pasado, cuando en algunos lugares de Europa, Australia, India y Estados Unidos se crearon los llamados “campos de aplicación”. El objetivo era eliminar las aguas residuales, y así evitar la contaminación de los ríos (Méndez y Gonzales, 2009).

Los altos rendimientos agrícolas necesita de un factor importante como es la calidad del agua, además adquiere cada día más actualidad e importancia debido a la limitación de los recursos hídricos, al aumento de la contaminación de ríos y a la excesiva explotación de las aguas subterráneas. El uso de agua de mala calidad puede ocasionar problemas en el suelo y en los cultivos; estos pueden ser problemas de salinidad; disminución de la tasa de infiltración, toxicidad específica sobre los cultivos y otros (Bonet y Calzadilla, 2011).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la extracción total del agua en el Ecuador se estimaba en 16,985 millones de m<sup>3</sup>/año, de los cuales se destina al uso agrícola 13,929 millones de m<sup>3</sup>/año (82%), principalmente para agricultura de exportación y monocultivos de arroz, banano, cacao, café, flores, hortalizas y frutas. Para el uso y abastecimiento de agua a poblaciones, se estiman 2,100 millones de m<sup>3</sup>/año (12,3%) y uso industrial 956 millones de m<sup>3</sup>/año (5,6%).

Las aguas residuales agrícolas en la mayor parte del territorio nacional se caracterizan por sus altos contenidos de nitratos, fosfatos, metales pesados, procedentes de las industrias, minería, fertilizantes, pesticidas, plaguicidas y biocidas en general, la

minería está aportando metales pesados a las fuentes de aguas y que afectan a la salud humana, flora y fauna, generando una fuerte contaminación. En el Ecuador, de cada 100 litros de agua se emplea: 81,1 en agricultura (riego), 12,3 en uso doméstico, 6,3 en industria y 0,3 en otros usos (SENAGUA, 2011).

El Gobierno Provincial de Tungurahua (2014), manifiesta que el canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato tiene una longitud de 36,829 km que se alimenta con las aguas de la cuenca del río Cutuchi, estas aguas son usadas para regar un número considerable de hectáreas de terrenos en la provincia de Cotopaxi y parte de Tungurahua. Los factores contaminantes del canal son las aguas servidas de las ciudades asentadas a lo largo de la cuenca alta del río, los efluentes de las industrias que se encuentran en los márgenes del río, los plaguicidas utilizados en las labores agrícolas de la cuenca alta, cuya calidad del agua es inadecuada para todos los usos, los parámetros fisicoquímicos del agua afectan la producción de hortalizas, la reducción del rendimiento está entre el 25 al 30 %.

Carballo et al. (2012), en su trabajo de investigación denominado “Capacidad de captura de cadmio y cinc por bacterias, microalgas y levaduras“, indica que las bacterias Gram negativas como *Pseudomonas mendocina* tiene capacidad en la remoción de metales pesados. Estos resultados indican la potencialidad de las bacterias Gram negativas en la captura de los metales cinc y cadmio. La membrana externa de este grupo fisiológico de bacterias está compuesta por lipopolisacáridos (LPS), fosfolípidos y proteínas, de ahí que ofrezca abundantes grupos funcionales para la unión de un rango amplio de metales. Este estudio confirma que las células microbianas pueden ser efectivas en los procesos de captura de metales y que diferentes especies microbianas son capaces de expresar de forma natural sus capacidades de captura de iones de cinc y cadmio por encima de  $15 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$  de biomasa. Microorganismos con estas capacidades de carga de metales podrían resultar beneficiosos en la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados

Revelo et al. (2015), mediante el trabajo de investigación “Uso de Microorganismos Nativos en la Remoción Simultánea de Materia Orgánica y Cr (VI)<sup>1</sup> en una Celda de Combustible Microbiana de Biocátodo (CCM)” manifiesta que bajo las condiciones experimentales propuestas, tanto los microorganismos procedentes de las aguas del río Pasto contaminadas con efluentes de curtiembres como los presentes en los lodos sulfidogénicos, formaron biocátodos para la reducción de Cr (VI). Es importante destacar que este trabajo aporta conocimiento sobre microorganismos reductores de Cr (VI) que se encuentran en la región y a futuro podrían emplearse como inóculo para el tratamiento de aguas residuales. En varios estudios se ha demostrado que salvo algunas excepciones, las bacterias aisladas a partir de sitios contaminados con Cr (VI) son reportadas como altamente resistentes.

Alanis (2004), manifiesta que bacterias del genero *Pseudomonas* tiene varias aplicaciones en biotecnología, debido a su capacidad catabólica y de resistencia, conferida por plasmidos. Entre sus principales aplicaciones esta la de biorremediación de suelos con petróleo, pesticidas, metales pesados, dando como resultado una mayor eficiencia en procesos que buscan la recuperación de ecosistemas contaminados, la generación de estrategias de biocontrol en la agricultura y la conservación de recursos naturales debido a la reducción de uso de pesticidas.

El diario La Hora en su reporte, Peligrosas aguas del río Cutuchi, de noviembre del (2008), indica que en las aguas del río Cutuchi se ha detectado, la presencia de contaminantes biológicos como: coliformes fecales, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, que ocasionan enfermedades de los tractos urinarios, digestivos y respiratorios, estas circunstancias revelan la gravedad e intensidad de la contaminación del agua con desechos domésticos, hospitalarios, camales, industriales, lavadoras de carros, etc. Además, en el río Cutuchi se aprecia la presencia de elementos en las descargas residuales e industriales, en igual forma, que escurren metales pesados como: mercurio, plomo, cadmio, también, plaguicidas, fertilizantes, lubricantes.

---

<sup>1</sup> Cr (VI)= Cromo hexavalente

El uso de poblaciones de microorganismos nativos proporciona una ventaja ya que están adaptados a las condiciones del microambiente, lo que permite la formación de una película microbiana más resistente y estable que garantiza su eficiencia en el proceso. Los niveles excesivos de cobre en aguas residuales para riego afecta el crecimiento de los cultivos y las actividades de los microorganismos en el suelo. En este propósito, esta investigación indica que una variedad de bacterias Gram negativas sean más utilizadas en procesos de biorremediación ya que algunas tienen la capacidad de producir exopolímeros o capsulas, sin embargo las bacterias que demostraron mejor tolerancia y crecimiento en concentraciones más altas poseen otro tipo de mecanismo que les permiten la capacidad de resistir concentraciones altas de metales pesados, esto puede suceder con bacterias como *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp* y *Stenotrophomonas sp* las cuales poseen características de reducción de Cr (VI) a Cr (III) por enzimas solubles en el citoplasma conocidas como cromo reductasas. (Vásquez et al, 2014)

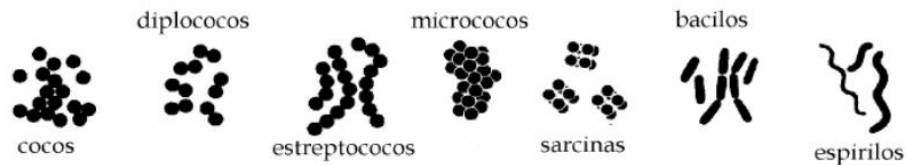
Quinaluisa (2016), en su trabajo de investigación titulado “Análisis de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato” pudo determinar que, levaduras aisladas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato presentan una amplia tolerancia al estrés generado por Cd (53,85% de las especies), Cr (69,23%), Ni (69,23%), Pb (76,92%) y Zn (100%) a concentraciones preliminares de 0.2 mM y 2 mM. *Pichia kluyveri*, *Candida oleophila*, *Pichia fermentans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* y *Metschnikowia pulcherrima* presentaron un amplio rango de tolerancia hacia todos los metales en análisis.

## **2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES**

### **2.2.1 Bacteria**

Las bacterias son microorganismos unicelulares haploides que carecen de organelos en su citoplasma y presentan en la mayoría de los casos un solo cromosoma circular con ADN de doble cadena, aunque también, suele observarse en ciertos casos ADN lineal y circular a la vez, moléculas que contienen información genética codificada la cual se expresa a través del ARN mensajero y proteínas específicas de modo que el comportamiento y las características bacterianas se encuentran regidas por el material

genético. Aunque, las formas de las bacterias son muy diversas se las ha agrupado en: alargadas (bacilos), esféricas (cocos) y en forma espiral (espirilos). A su vez, estas pueden asociarse en grupos, formando parejas (diplococos), cadenas (estreptococos) y racimos (estafilococos); estas formaciones suelen ser características de un género o especie específico. (Arellano y Yambay, 2016)



*Figura 1.* Apariencia físicas generales de las bacterias.

El tamaño de las bacterias varía desde menos de una micra hasta 10 micras de longitud, y de 0.2 a 1 micra de anchura, las bacterias están recubiertas por una pared celular que en gran parte están constituidas por un complejo de carbohidratos y proteínas denominado peptidoglicano. (Duque, 2016).

#### **2.2.1.1. Cepa Bacteriana**

Una cepa es un conjunto de células homogéneas provenientes de la reproducción de una célula inicial única, aislada y purificada. Específicamente, una cepa proviene de un mismo antecesor común por lo que poseen la misma información genética. La estructura y actividad biológica simple, rápida reproducción y ciclo de vida corto de las bacterias permiten aplicarlas en procesos de sistemas de remediación biológica y por su capacidad de resistir a compuestos ambientales tóxicos y en muchos casos integrarlos en su metabolismo son usadas en la biotecnología ambiental (Duque, 2016).

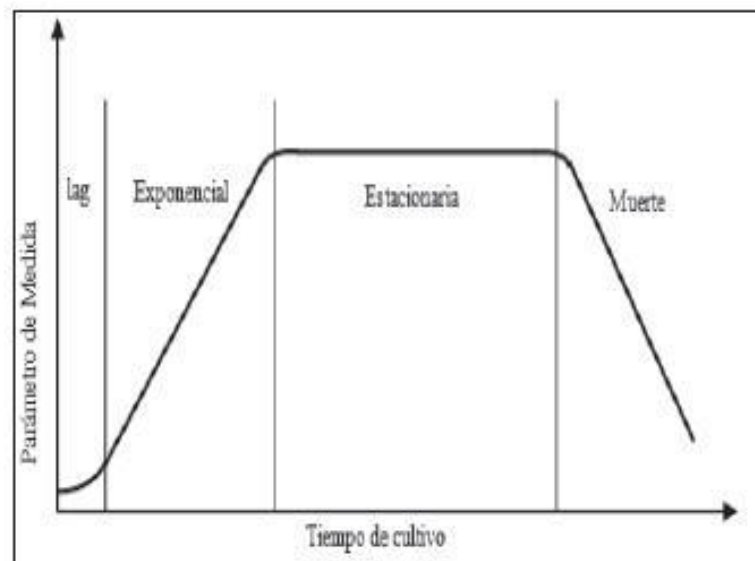
#### **2.2.1.2. Reproducción bacteriana**

Las bacterias en su mayoría se reproducen asexualmente por un mecanismo denominado fisión binaria o división celular, donde la célula crece, duplica su material genético y como resultado se originan dos células; cada célula repite el mismo proceso,

son generalmente de vida libre y poseen ADN. Su información genética está en un único cromosoma bacteriano circular, pueden tener información complementaria en forma de plásmidos, estos codifican genes como la resistencia a antibióticos, metales pesados (Leadbetter y Poindexter, 2013).

### 2.2.1.3. Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano es el proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del crecimiento (ciclo celular), tiene lugar la replicación del material de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición de la bacteria. Cuando la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división forman una suspensión de células libres, en cambio, cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un medio sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia (Salvucci, 2010).



*Figura 2.* Curva de crecimiento bacteriano

### 2.2.2. Tratamientos de agua para riego

### **2.2.2.1. Tratamiento Físico-químico**

El tratamiento fisicoquímico de aguas residuales para riego se basa en la eliminación de los contaminantes hasta alcanzar los valores máximos permisibles de acuerdo a las normas y estándares nacionales o internacionales, este tratamiento consta, básicamente, de dos etapas: coagulación y floculación. La primera se fundamenta en conseguir que las materias coloidales y en suspensión existentes en el agua formen coágulos, mediante cambios de polaridad. Seguidamente, en la fase de floculación estos coágulos se acumulan formando flóculos, lo que permite su fácil separación del agua tratada. En el tratamiento fisicoquímico de aguas residuales para riego se separan componentes contaminantes no disueltos en el agua sin alterar, en principio, los componentes disueltos, al producirse una adición de reactivos químicos (coagulantes, floculantes, neutralizadores de pH) se modifica la estructura química y se produce precipitación de componentes que estaban disueltos en el agua. (Alemany, 2004)

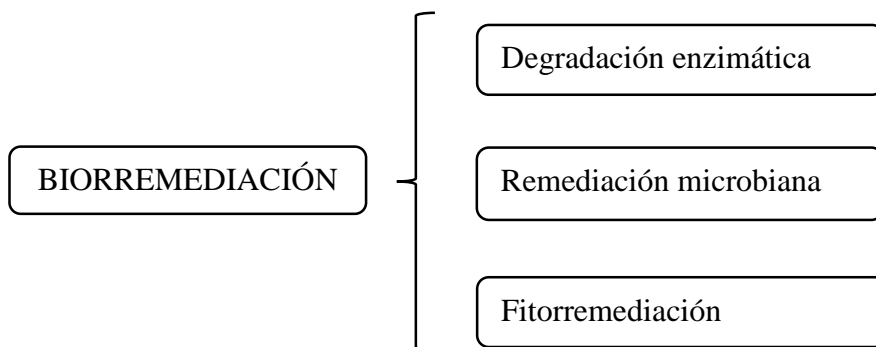
### **2.2.2.2. Tratamiento Biológico**

#### **2.2.2.2.1. Biorremediación**

La biorremediación es una técnica que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos como bacterias, hongos y levaduras para transformar contaminantes presentes en un medio natural, en compuestos poco o nada contaminantes, con el fin de realizar una mineralización, una transformación parcial, la humificación de los residuos o de agentes contaminantes y una alteración del estado redox de los metales y, por lo tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas. En su aplicación con metales pesados no son metabolizados por los microorganismos de manera apreciable, pero pueden ser inmovilizados o precipitados, si estos microorganismos son propios de la zona se los conoce como autóctonos, mientras que si pertenecen a otros sitios se los conoce como exógenos. Así mismo, si la biorremediación se realiza en el lugar de la contaminación se la conoce como in situ, mientras que si el tratamiento de los contaminantes se da en biorreactores o fuera del lugar de la contaminación se la llama ex situ. (Alarcón y Ferrera, 2013)

#### **2.2.2.2.1.1. Tipos de Biorremediación**

Para procesos de biorremediación se utilizan microorganismos o plantas capaces de degradar o acumular sustancias contaminantes tales como metales pesados y compuestos orgánicos derivados de petróleo o sintéticos. Básicamente, los procesos de biorremediación pueden ser de tres tipos:



*Figura 3.* Diferentes modos de biorremediación

#### **2.2.2.2.1.2. Degradación enzimática**

Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen en cantidades industriales por bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente que son comercializadas por las empresas biotecnológicas. Hay enzimas que rompen polímeros utilizados de forma similar, son las celulasas, proteinasas y amilasas, que degradan celulosa, proteínas y almidón, respectivamente. Además, de hidrolizar estos polímeros, existen enzimas capaces de degradar compuestos altamente tóxicos. Estas enzimas son utilizadas en tratamientos en donde los microorganismos no pueden desarrollarse debido a la alta toxicidad de los contaminantes. Por ejemplo, se emplea la enzima peroxidasa para iniciar la degradación de fenoles y aminas aromáticas presentes en aguas residuales de muchas industrias. (Carreño, 2015)

#### **2.2.2.2.1.3. Remediación microbiana**

En este tipo de remediación se usan microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Los microorganismos utilizados en biorremediación pueden ser los ya



existentes (autóctonos) en el sitio contaminado o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser agregados o inoculados (Carreño, 2015).

La descontaminación se produce debido a la capacidad natural que tienen ciertos organismos de transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas. Existen, por ejemplo, bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, acetona, pesticidas, herbicidas, éteres, alcoholes simples, entre otros. Los metales pesados como uranio, cadmio y mercurio no son biodegradables, pero las bacterias pueden concentrarlos de tal manera de aislarlos para que sean eliminados más fácilmente. Las actividades microbianas en el proceso de biorremediación se pueden resumir en el siguiente esquema:

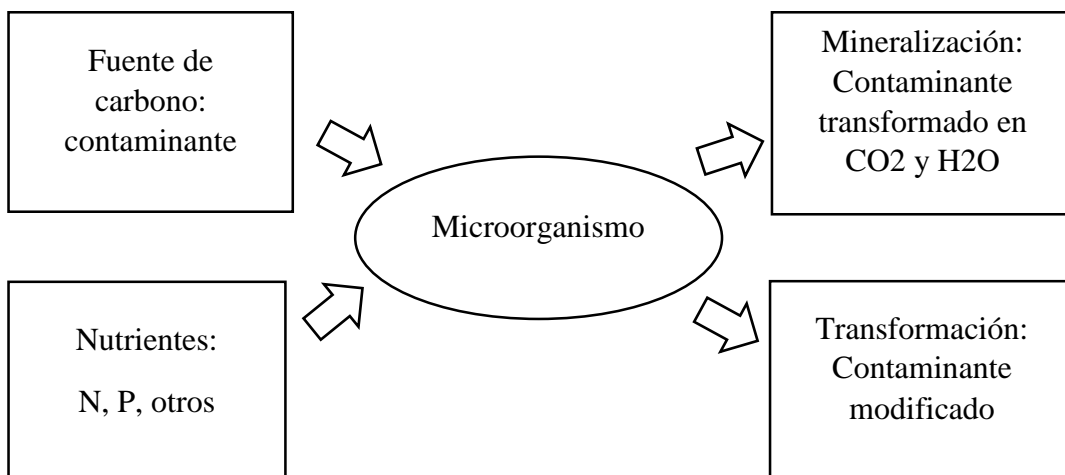


Figura 4. Metabolismo Microbiano

#### 2.2.2.2.2. Fitorremediación

En el siglo XVIII Joseph Priestley, Karl Scheele y Antoine Lavoisier demostraron que en presencia de luz las plantas son capaces de descontaminar la atmosfera. Sin

embargo no fue sino hasta los años 70 que se reconoció la habilidad de las plantas para limpiar aguas y suelos contaminados. Y así, en los años 90 surgió el concepto de fitorremediación.

Esta tecnología utiliza plantas para limpiar ambientes contaminados y constituye una estrategia muy interesante debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de remover, transferir, estabilizar y/o destruir altas concentraciones de contaminantes como metales pesados y puede aplicarse tanto in situ como ex situ. (Agudelo et al., 2012). Por su parte, la especie *Scirpus californicus* conocida como totora, es una planta acuática que acumula grandes concentraciones de cadmio en sus raíces (Fernández y Padilla, 2013).

Entre las ventajas de la fitorremediación son las siguientes:

1. Las plantas pueden ser utilizadas como bombas extractoras de bajo costo para depurar aguas contaminadas.
2. Algunos procesos degradativos ocurren en forma más rápida con plantas que con microorganismos.
3. Es un método apropiado para descontaminar superficies grandes o para finalizar la descontaminación de áreas restringidas en plazos largos.

### **2.2.3. Metales Pesados**

Son sustancias propias de la naturaleza de peso molecular alto, su densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua y su concentración en el ambiente puede actuar como potentes tóxicos para los ecosistemas, según cuales sean las vías de exposición, la naturaleza química del metal, los iones de metales pesados presentes en los abastecimientos de agua superficiales y subterráneos, se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente. (Cañizares, 2000)

Puyen (2013), menciona que los metales pesados están presentes naturalmente en los suelos, pero en los últimos años las actividades industriales y la disposición de residuos de todo tipo han contribuido a una acumulación de estos elementos en aguas de riego y suelos. Ahora bien, la presencia de metales pesados en aguas de río constituye un

serio problema de tipo ambiental debido a su toxicidad y a sus repercusiones en los cultivos, animales y seres humanos. Al mismo tiempo, los metales pesados forman asociaciones con sustancias minerales como: carbonatos, sulfatos, nitratos y en mayor grado con sustancias orgánicas por medio de fenómenos de intercambios químicos, acumulándose en sistemas acuáticos (Yépez, 2011), tabla 1.

**TABLA 1. PRINCIPALES ORIGENES ANTROPOGÉNICOS DE LOS METALES PESADOS**

ORIGEN	Sb	As	Cd	Cu	Cr	Hg	Ni	Pb	Zn
Baterías eléctricas			x	x					
Curtido de pieles				x	x				
Electricidad y electrónica			x	x	x		x	x	x
Farmacéutica		x		x	x				x
Fertilizantes		x	x	x	x	x	x	x	x
Fotografía			x	x	x			x	
Minería	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Motores			x	x	x				x
Pigmentos, pinturas	x		x	x	x		x	x	x
Plásticos	x		x		x			x	x
Textiles	x			x	x				x

Fuente: Yépez, 2011.

En el Ecuador para determinar la calidad de agua de riego se basa en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente, cuyos parámetros se detallan en la siguiente tabla:

**TABLA 2. CRITERIOS DE CALIDAD ADMISIBLES PARA AGUAS DE USO AGRÍCOLA EN RIEGO.**

PARÁMETROS	EXPRESADO COMO	UNIDAD	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE
Aluminio	Al	mg/l	5,0

Arsénico	As	mg/l	0,1
Berilio	Be	mg/l	0,1
Boro	B	mg/l	0,75
Cadmio	Cd	mg/l	0,05
Cinc	Zn	mg/l	2,0
Cobalto	Co	mg/l	0,01
Cobre	Cu	mg/l	0,2
Cromo hexavalente	Cr+6	mg/l	0,1
Flúor	F	mg/l	1,0
Hierro	Fe	mg/l	5,0
Litio	Li	mg/l	2,5
Mercurio	Hg	mg/l	0,001
Manganeso	Mn	mg/l	0,2
Molibdeno	Mo	mg/l	0,01
Níquel	Ni	mg/l	0,2
Plomo	Pb	mg/l	5,0
Selenio	Se	mg/l	0,02
Vanadio	V	mg/l	0,1

Fuente: TULAS, 2010.

### 2.2.3.1. Cobre (Cu)

El cobre es un elemento esencial para mantener un correcto metabolismo en los seres vivos. Sin embargo, pasado cierto umbral se vuelve tóxico, la toxicidad de cobre podría resultar, por ejemplo, de la contaminación del agua de riego y suelo, bioacumulándose en cultivos en un cierto plazo de tiempo. El efecto tóxico de cobre sobre microorganismos según estudios es debido a la liberación de radicales de hidroperóxido, los iones de cobre potencialmente podrían sustituir iones esenciales para el metabolismo del microorganismo como el hierro, interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel del citoplasma alterando la síntesis proteica. (Prieto et al., 2009)

Los compuestos de cobre como abonos y pesticidas, por ejemplo la cal cúprica y los quelatos de cobre usados en la agricultura se encuentran en el agua y en el suelo, siendo éstos los más peligrosos para los seres humanos. El cobre que pasa al suelo formando lodos se adhiere fuertemente a la materia orgánica y puede viajar grandes distancias en el agua superficial suspendido en forma de iones libres. (Rodríguez, 2016)

#### **2.2.3.2. Cadmio (Cd)**

Es un elemento relativamente raro en la naturaleza, se encuentra asociado al cinc, cobre, plomo y fósforo, presenta gran afinidad por el azufre, de allí que su compuesto natural más común es el sulfuro de cadmio (CdS). Entre los metales pesados que pueden estar presentes en aguas residuales para riego es el cadmio, el cual genera más riesgos ambientales por su movilidad en los suelos y la facilidad con que es absorbido por las plantas (Herrera, 2011).

El cadmio no tiene ninguna función fisiológica conocida en los vegetales y su presencia en los suelos puede limitar la absorción y translocación dentro de la planta de otros elementos que también forman iones divalentes como calcio, magnesio, cinc, hierro y manganeso. Dentro de la planta interfiere en los procesos de respiración y fotosíntesis, se combina con el azufre presente en las enzimas que tienen este elemento en su composición y da origen a un proceso de estrés oxidativo, que produce daño celular en los tejidos y el cual se caracteriza por el incremento de las concentraciones de especies químicas como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), iones peróxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e hidróxido (OH<sup>-</sup>) y radicales libres. (Herrera, 2011)

#### **2.2.3.3. Biodisponibilidad de metales pesados**

Según Gonzales (2011), indica que la biodisponibilidad es la concentración de metales pesados en las fases del suelo que esta disponible para la absorción de los microorganismos y depende de la solubilidad y movilidad de los metales en la solución del suelo. Así, algunas bacterias pueden reducir la biodisponibilidad de metales pesados como: Hg, As, Cu, Cr, Cd, Zn.

#### **2.2.3.4. Mecanismo de resistencia a metales**

La resistencia a metales pesados es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustratos diferentes, pero que comparten las mismas funciones. Algunos de estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula frente a metales potencialmente dañinos, así como

frente a las especies que estos producen al interactuar con los componentes celulares. Otros están muy especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas, confiriéndoles la capacidad de resistencia a metales pesados. (Marrero, 2010).

Los microorganismos tienen acceso a compuestos adsorbidos sobre las partículas del suelo y a contaminantes depositados en las fase solubles del suelo. Con relación a procesos bioremediadores asociados a la remoción de metales pesados, los mecanismos son variados teniendo en cuenta que los metales pesados en el ambiente no son eliminados; por el contrario, son sometidos a procesos de transformación o inmovilización para disminuir su biodisponibilidad y por ende su poder tóxico. Además, de agentes fisicoquímicos como presencia de quelantes, arcillas en el suelo y cambios en el pH, los microorganismos ejercen mecanismos de acomplejamiento, adsorción y solubilización mediante reacciones de óxido reducción directa o indirecta, metilación, de alquilación y precipitación. (Gómez, 2011)

## **CAPÍTULO III**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

Ha= Al menos una cepa bacteriana aislada del canal Latacunga-Salcedo-Ambato tiene resistencia a la presencia de 2mM de Cu y Cd.

Ho= Las cepas bacterianas aisladas del canal Latacunga-Salcedo-Ambato no tienen resistencia a la presencia de 2mM de Cu y Cd.

#### **3.2. OBJETIVOS**

##### **3.2.1. Objetivo General**

Evaluar la resistencia de cepas bacterianas a metales pesados en la zona del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato.

##### **3.2.2. Objetivos Específicos**

Determinar la concentración de metales pesados del agua del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato en la zona de Cunchibamba de la Provincia de Tungurahua.

Evaluar la resistencia de cepas bacterianas con potencial biorremediador a metales pesados.

Seleccionar las cepas microbianas resistentes con potencial biorremediador de metales pesados Cu y Cd.

## **CAPÍTULO IV**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **4.1. UBICACIÓN DE EXPERIMENTO**

La investigación se realizó en el laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, situada en el cantón Cevallos, al sur de la ciudad de Ambato, con una altitud de 2850 msnm, cuyas coordenadas geográficas son: Latitud: 01°24'00'' S, Longitud: 78°35'00'' W, tomadas con Sistema de Posicionamiento Global (G.P.S.).

#### **4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR**

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Química, ubicado en los predios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Considerando que el ensayo se realizó bajo condiciones de ambiente controlado por el investigador, se tuvo como parámetros los siguientes: temperatura de 29 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) y una humedad ambiental en el laboratorio de 58%.

#### **4.3. EQUIPOS Y MATERIALES**

##### **4.3.1. Material experimental**

Las cepas bacterianas usadas en la presente investigación fueron tomadas 10 cepas de la colección de microorganismos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, las cuales se encuentran codificadas como BUTA 1 al 40.

##### **4.3.2. Equipos**

Autoclave (MIDMARK), Balanza analítica (ADAM), Cámara de flujo laminar (BIOBASE), Espectrofotómetro visible (GENESYS™ 20), Incubadora (Red Line),



Microscopio con cámara (MOTIC), Refrigerador Indurama (Ri 785 Side By Side), Vortex Mixer (VM 300P).

#### 4.3.3. Materiales

Agua destilada, asa de siembra de microorganismos, caja de láminas porta y cubre objetos, cajas de Petri desechables, cinta parafilm, frascos Boeco, goteros plásticos, gradillas, marcadores, mechero de alcohol, micropuntas estériles, papel aluminio, pinzas de metal, pipetas automáticas, tubos microbiológicos, vasos de precipitación.

#### 4.3.4. Reactivos

Alcohol antiséptico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), Alcohol cetona (70% etanol absoluto y 30% acetona), Alcohol industrial ( $\text{CH}_3\text{-OH}$ ), Safranina ( $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClH}_4$ ), Cristal violeta ( $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{Cl}$ ), Cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  May & Baker, Inglaterra), Lugol (94% agua destilada, 4% yoduro de potasio USP y 2% de yodo), Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  Baker Analyzed®, ACS), Potatoe Dextrose Agar (Difco TM, Francia), Extracto de carne (Microquin), Peptona (Microquin).

### 4.4. FACTOR DE ESTUDIO

#### 4.4.1. Cepas bacterianas

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN <sup>2</sup>
B1	BUTA4
B2	BUTA5
B3	BUTA6
B4	BUTA7
B5	BUTA9
B6	BUTA10
B7	BUTA13
B8	BUTA15
B9	BUTA16
B10	BUTA19

<sup>2</sup> Material biológico codificado

#### 4.4.2. Metales pesados

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN
M1	Control
M2	2 mM Cu
M3	2 mM Cd

#### 4.5. TRATAMIENTOS

Los tratamientos aplicados y que resultan de la combinación de los factores en estudio se presenta en la Tabla 3.

TABLA 3. TRATAMIENTOS INVESTIGADOS

<b>TRATAMIENTOS</b>		
<b>Nº</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Descripción</b>
1	B1M1	B1+caldo nutritivo
2	B1M2	B1+2 mM Cu
3	B1M3	B1+2 Mm Cd
4	B2M1	B2+caldo nutritivo
5	B2M2	B2+2 mM Cu
6	B2M3	B2+2 Mm Cd
7	B3M1	B3+caldo nutritivo
8	B3M2	B3+2 mM Cu
9	B3M3	B3+2 Mm Cd
10	B4M1	B4+caldo nutritivo
11	B4M2	B4+2 mM Cu
12	B4M3	B4+2 Mm Cd
13	B5M1	B5+caldo nutritivo
14	B5M2	B5+2 mM Cu
15	B5M3	B5+2 Mm Cd
16	B6M1	B6+caldo nutritivo
17	B6M2	B6+2 mM Cu
18	B6M3	B6+2 Mm Cd
19	B7M1	B7+caldo nutritivo
20	B7M2	B7+2 mM Cu
21	B7M3	B7+2 Mm Cd
22	B8M1	B8+caldo nutritivo
23	B8M2	B8+2 mM Cu
24	B8M3	B8+2 Mm Cd
25	B9M1	B9+caldo nutritivo
26	B9M2	B9+2 mM Cu
27	B9M3	B9+2 Mm Cd
28	B10M1	B10+caldo nutritivo
29	B10M2	B10+2 mM Cu
30	B10M3	B10+2 Mm Cd

## **4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se aplicó un diseño experimental de bloques completos al azar en arreglo factorial A\*B (10\*3), utilizando 10 cepas bacterianas, 2 metales pesados: cadmio, cobre y 1 control, con tres repeticiones.

## **4.7. VARIABLE RESPUESTA**

### **4.7.1. Análisis fisicoquímico de agua de riego**

Se recolectó 1000 ml de muestra de agua del canal Latacunga-Salcedo-Ambato en un envase de vidrio estéril, el punto de muestreo fue ubicado en las coordenadas 0766037 E; 9874156 N UTM, para luego ser llevado al respectivo análisis en el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) de la ESPOCH.

### **4.7.2. Caracterización macroscópica**

Se observó el margen, forma, elevación, superficie y características ópticas de las diez colonias bacterianas en estudio.

### **4.7.3. Caracterización microscópica**

Se realizó la tinción de Gram para identificar las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

### **4.7.4. Crecimiento bacteriano en placa**

Se estableció de la siguiente manera: nulo crecimiento (-), poco crecimiento (+), medio crecimiento (++) y completo crecimiento (+++).

### **4.7.5. Absorbancia**

La absorbancia se midió a 595 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro.

## **4.8. MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **4.8.1. Análisis de agua de riego**

El método EPA 200.7 (ICP-AES) Rev. 4.4 1994 plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de emisión atómica, se utiliza para determinar metales y algunos elementos no metálicos en solución. Este método es una consolidación de los métodos existentes para el agua, aguas residuales y sólidos residuales.

El método consiste en la determinación de elementos múltiples utilizando instrumentos secuencial o simultánea. Los instrumentos de medida característica de línea de espectros de emisión atómica por espectrometría óptica.

### **4.8.2. Selección de cepas bacterianas de estudio**

Se seleccionó diez cepas bacterianas al azar del banco de microorganismos existente en la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Las cepas aisladas corresponden a cuatro puntos de muestreo como indica la Tabla 4.

**TABLA 4. PUNTOS DE MUESTREO PARA CEPAS BACTERIANAS**

<b>SITIO DE MUESTREO</b>	<b>COORDENADAS</b>
En la entrada del canal principal	0760004 E; 9907563 N UTM
En el canal principal al ingreso a la parroquia Cunchibamba	0765889 E; 9876342 N UTM
En el ingreso de un lote hortícola	0766036 E; 9874153 N UTM
Al final del lote hortícola	0766412 E; 9874212 N UTM.

Fuente: Castillo, 2014.

### **4.8.3. Purificación y almacenamiento de las cepas bacterianas**

Una vez seleccionado las bacterias en estudio, se procedió a realizar el repique en cajas de Petri que contenía 25 ml de medio de cultivo PDA (Difco TM ), mediante una estría simple se sembró la cepa bacteriana y se dejaron crecer en una incubadora (Red Line) por un periodo de 48 horas a 29 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

#### 4.8.4. Caracterización macroscópica de bacterias

Las cepas puras se almacenaron en el refrigerador Indurama (Ri 785 Side By Side) a 3 °C, mediante la observación directa del crecimiento de colonias de bacterias se caracterizó de acuerdo a la forma, elevación, margen, superficie y características ópticas, como se muestra en la siguiente figura.

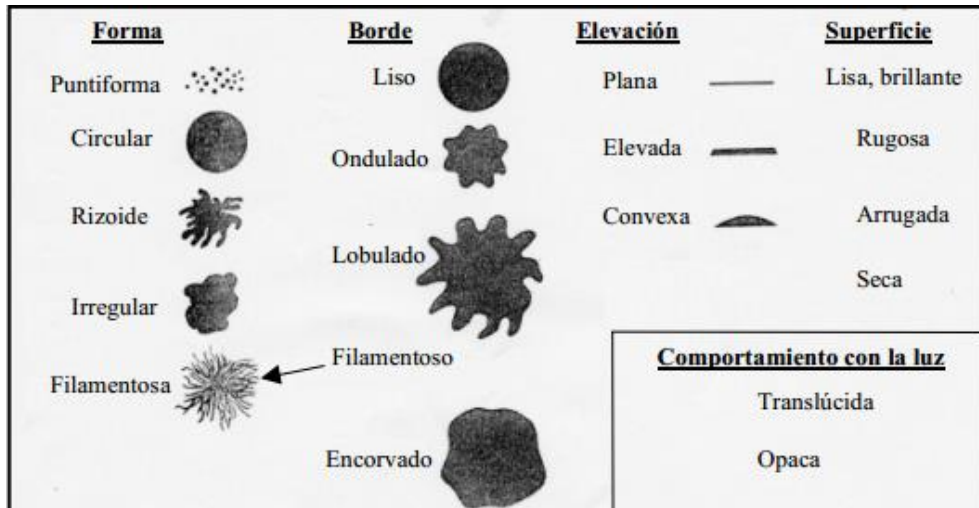


Figura 5. Morfología y crecimiento de las colonias

#### 4.8.5. Caracterización microscópica de bacterias

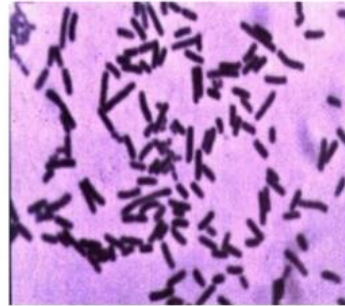
La tinción de Gram es un procedimiento rápido que se usa para caracterizar las bacterias como Gram positivas o Gram negativas en base a las propiedades químicas y físicas de sus paredes celulares. La tinción de Gram es el primer paso en la identificación bacteriana (Guedea, 2007).

Se preparó un frotis de la bacteria con una pequeña gota de agua en un porta objetos limpio y se secó a temperatura ambiente, luego se procedió a teñir por 1 minuto con cristal violeta y se lavó con agua destilada el exceso, seguidamente se cubrió con una solución de Lugol durante 1 minuto y nuevamente se lavó con agua destilada el exceso para continuar se añadió alcohol cetona por 15 segundos, luego se cubrió con Safranina durante 1 minuto, se lavó con agua destilada el exceso y finalmente se esperó que se seque al ambiente. Posteriormente se colocó una pequeña gota de aceite de inmersión y el cubre objetos, para ser observada con el lente de inmersión en el microscopio.

Bacterias Gram negativas



Bacterias Gram positivas



*Figura 6.* Interpretación de la tinción de Gram

#### **4.8.6. Ensayo de resistencia bacteriana a metales pesados**

##### **4.8.6.1. Concentración del metal**

La concentración final utilizada para cadmio y cobre fue de 2mM. Para lo cual se preparó las soluciones de la siguiente manera: se utilizó el sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) como compuesto base para cobre.

$\text{CuSO}_4$  peso atómico= 249.68 g/mol

Se usó el cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) como compuesto base para cadmio.

$\text{CdCl}_2$  peso atómico= 183,32g/mol

##### **4.8.6.2. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio sólido**

Mediante este análisis se observó el crecimiento de colonias bacterianas en PDA previamente adicionado el metal pesado a una concentración final de 2 mM. Se usó como control bacterias que no fueron sometidas al tratamiento con metal pesado, y se tomó los datos a las 48 horas, clasificando con la siguiente valoración, la cual hace referencia Serrano.

TABLA 5. VALORACIÓN CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

DESCRIPCIÓN	VALOR	
	CUALITATIVO	CUANTITATIVO
Nulo crecimiento	-	0
Poco crecimiento	+	5
Medio crecimiento	++	10
Mayor o completo crecimiento	+++	15

Fuente: Serrano, 2015.

Elaborado por: Daniel Reinoso, 2016.

#### 4.8.6.3. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio líquido

Por medio de la técnica de espectroscopia se realizó la medición de absorbancia de soluciones que contenía caldo nutritivo con metal y bacteria en concentración de 2 mM, a una longitud de onda de 595 nm. Se midió la absorbancia después de 48 horas de incubación a 29 ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), para lo cual se llevó a cabo el siguiente protocolo: Se Preparó caldo nutritivo con 5g peptona y 3g extracto de carne en 1000ml de agua destilada (INEN, 1999). Previo al ensayo se esterilizó las soluciones líquidas, material de vidrio y micropuntas en el autoclave (MIDMARK), por 15 minutos a 126 °C. Antes de introducir los materiales a la cámara de flujo laminar se desinfecto por 10 minutos con la luz ultra violeta. Luego, se rotuló los tubos microbiológicos y se agregó caldo nutritivo más bacteria y más metal, se usó como control bacterias que no fueron sometidas al tratamiento con metal pesado, como se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 6. DISTRIBUCIÓN DE TUBOS MICROBIOLÓGICOS

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Solución madre	Control	Cobre	Cadmio
2000 ul de caldo nutritivo+biomasa bacteriana	1900 ul de caldo nutritivo+100 ul de solución madre	1880 ul de caldo nutritivo+20 ul de metal+100 ul de solución madre	1700 ul de caldo nutritivo+200 ul de metal+100 ul de solución madre

Fuente: Serrano, 2015.

Elaborado por: Daniel Reinoso, 2016.



Para determinar las cantidades de volumen del metal pesado a concentración final de 2 mM, se efectuó la siguiente ecuación:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

En donde:

$C_i$  = concentración inicial

$V_i$  = volumen inicial

$C_f$  = concentración final

$V_f$  = volumen final

Volumen para  $CdCl_2$  a 2 mM:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$20 \text{ mM} * x = 2 \text{ mM} * 2 \text{ ml}$$

$$V_f = 200 \text{ ul}$$

#### **4.9. Procesamiento de la información**

Para procesar los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se utilizó el análisis de varianza (ADEVA), y de las fuentes de variación que resultaron significativas se aplicó la prueba de Tukey al 5%, con el programa Infostat versión 2015.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. Análisis y discusión de resultados

##### 5.1.1. Resultados del análisis del agua de riego

TABLA 7. PARÁMETRO FSICOQUÍMICO DE LA MUESTRA DEL CANAL LATACUNGA-SALCEDO-AMBATO

Punto de Muestreo	Ubicación (cordenadas UTM)	pH
01	17 M 0766037 E; 9874156 N	7,08

UTM: Sistema de coordenada universal transversal de Mercator

Elaborado por: Daniel Reinoso, 2016.

La muestra de agua de riego para el análisis fue recolectada en el canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato, ubicado en la parroquia Cunchibamba del cantón Ambato. En la (Tabla 7) se observa el valor de pH, el cual está dentro del rango neutral indicando las condiciones favorables del agua de riego. “En el momento que el valor de pH se encuentre en rango menor al neutral interfiere en la solución acuosa del suelo incidiendo en las condiciones generales de fertilidad del suelo” (Padilla, 2015). El pH del suelo es importante porque los vegetales sólo pueden absorber a los minerales disueltos y la variación del pH modifica el grado de solubilidad de los minerales, así tenemos que la cantidad de algunos metales pesados como hierro, cadmio, aluminio soluble en muchos suelos aumenta con la acidez. En este sentido Stevens et al. (2003), menciona que en suelos con diferentes pH y contenidos de materia orgánica, y donde se han añadido intencionalmente concentraciones de Pb y Zn, ha sido determinada la capacidad de la absorción de los mismos en cada tipo de suelo. Se sembró lechuga y después de cosechar las mismas se evaluaron nuevamente los suelos y se observó que

disminuyó la concentración de estos metales en los suelos, la adsorción de los metales pesados en el suelo está fuertemente condicionado por el valor de pH.

En el sitio de estudio sólo se analizaron los metales cobre y cadmio, debido al registro que tienen otros estudios respecto a la presencia de estos metales. En el (Anexo 1) se muestra el análisis fisicoquímico realizado por el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA), con el fin de conocer los metales contaminantes en el agua de riego del canal Latacunga-Salcedo-Ambato, el cual indica la presencia de Cu, Cd, Cr, Zn, As, Ni, Al, Pb, Se, Hg. Se observó en éste análisis que existen concentraciones aceptables y que ninguno de estos contenidos de metales pesados excede los límites permisibles para el uso agrícola de acuerdo a los parámetros establecidos para aguas de riego del TULAS. Una publicación del diario LA HORA (2008), indica que la alta susceptibilidad del canal a la contaminación por mercurio, plomo, cadmio, cobre, plaguicidas y fertilizantes es evidente, debido a que el afluente que lo alimenta recibe las descargas directas de aguas residuales, especialmente de industrias curtiembres, florícolas, ganaderas que están cercas al río Cutuchi, las cuales en los últimos años han contribuido a una acumulación de estos elementos en este medio y su disponibilidad variará según la forma en la que esté químicamente presente, lo que afectará su disposición y absorción por las plantas.

Una investigación previa al presente trabajo de titulación muestra que se determinó la concentración de Cd en tres puntos de muestreo del canal Latacunga-Salcedo-Ambato, encontrándose con concentraciones de Cd superiores al límite máximo permisible en agua de riego, siendo 0,0440, 0,0444 y 0,0484 mg/l (Quinaluisa, 2016). En el análisis fisicoquímico del presente trabajo de investigación no se encontraron niveles que excedan el valor permisible que es para cobre 2.0 mg/l y para cadmio 0.01 mg/l, por lo general las concentraciones de metales pesados en aguas de riego no superan los valores máximos permisibles. Según lo reportado por Mendez et al. (2009), manifiesta que los suelos donde han sido regados con aguas residuales tienen la capacidad de retener y acumular metales pesados y por esta causa metales pesados como: cadmio, níquel y plomo han llegado a acumularse en plantas de maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum spp*) y alfalfa (*Medicago sativa*), principalmente en tejido foliar, en hojas de la alfalfa, en granos de trigo e incluso los tallos de arveja (*Pisum sativum*) acumulan más cadmio que plomo en suelos tratados con dosis crecientes de metales.

### **5.1.2. Caracterización macroscópica de bacterias**

La caracterización macroscópica, a diferencia de las técnicas moleculares, permite obtener solamente información general sobre el aspecto de las colonias de bacterias, dichas colonias fueron caracterizadas según los siguientes parámetros: el margen, forma, elevación, superficie y características ópticas. Luego de 72 horas de incubación las diez cepas bacterianas produjeron colonias de forma circular e irregular, con superficie lisa y rugosa, margen entero, lobulado y erosionado, elevación plana y convexa, y de características ópticas opaca.

En el (Anexo 2), se muestra la caracterización macroscópica de los diez cultivos bacterianos en estudio. Con respecto al margen, las bacterias (BUTA) 5, 6, 7, 13, 15, 16, 19 presentan margen entero, las bacterias 4, 10 presentan margen erosionado y la bacteria 9 de margen lobulado. En cuanto a la forma, las bacterias 5, 6, 7, 13, 15, 16, 19 presentan forma circular y las bacterias 4, 9, 10 de forma irregular. A continuación, la elevación convexa presentaron las bacterias 6, 7, 9, 10, 13, 15 y elevación plana las bacterias 4, 5, 16, 19. Seguido de la superficie, las bacterias 4, 5, 6, 9, 13, 16, 19 presentaron lisa y las bacterias 7, 10, 15 superficie rugosa. Como ultimo parámetro que se analizó fue las características ópticas, el cual todas las bacterias se presentaron opacas .

### **5.1.3. Caracterización microscópica de bacterias**

Morfológicamente las colonias bacterianas difieren de una especie a otras y la tinción de Gram permitió analizar las morfologías microscópicas y la composición de la membrana celular de las bacterias. En el (Anexo 3), se muestra los resultados de la caracterización microscópica para las diez bacterias utilizadas en el estudio. En lo referente a la forma de las bacterias, las bacterias 6, 9, 10, 13, 15, 16 fueron identificadas como cocos, las bacterias 5, 7 como diplococos y las bacterias 4, 19 como estafilococos. En lo que se refiere a la tinción de Gram, las bacterias 4, 5, 6, 7, 10, 13, 15, 16, 19 presentaron una tinción de Gram negativa, mientras la bacteria 9 fue Gram positiva.

Di Paola y Vicién (2010), han encontrado en su investigación bacterias del genero *Pseudomonas* constituidos por bacilos Gram negativos, que se encuentran normalmente en el suelo, son patógenos en plantas y han sido denominados patógenos oportunistas pero esta bacteria tiene aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área de remediación de suelos. Por su parte, Wu et al. (2014), manifiesta que han aislado una cepa denominada LZ-11 de Lanzhou que puede resistir y absorber Cd (II). LZ-11 está estrechamente relacionada con *Enterococcus faecali* una bacteria de forma de cocos y Gram positiva. En general las bacterias Gram negativas como agentes de biorremediación son más resistentes a metales pesados que las bacterias Gram positivas, además será necesario realizar estudios posteriores sobre la identificación molecular de las cepas bacterianas por taxonomía para así establecer el genero y la especie de las bacterias estudiadas en la presente investigación.

#### 5.1.4. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio sólido

##### 5.1.4.1. Crecimiento bacteriano

TABLA 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE CRECIMIENTO BACTERIANO

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F
Tratamientos	29	1382,22	47,66	15,60 **
Cepas bacterianas (B)	9	854,44	94,94	31,07 **
Metales pesados (M)	2	150,56	75,28	24,64 **
B*M	18	377,22	20,96	6,86 **
Error	60	183,33	3,06	
Total	89	1565,56		

Media= 11,22

Coefficiente de variación= 15,58 %

\*\*= altamente significativo

Los valores correspondientes a la variable crecimiento bacteriano se reportan en el (Anexo 5). El análisis de varianza (Tabla 8) determinó que existen diferencias estadísticas altamente significativas para tratamientos, cepas bacterianas, metales

pesados y la interacción cepas bacterianas por metales pesados. El coeficiente de variación fue del 15,58 % y la media tuvo un valor de 11,22.

TABLA 9. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE CRECIMIENTO BACTERIANO

Tratamientos	Medias	Rangos
B9M1	15,00	A
B9M2	15,00	A
B9M3	15,00	A
B3M1	15,00	A
B7M2	15,00	A
B8M1	15,00	A
B7M3	15,00	A
B10M3	15,00	A
B7M1	15,00	A
B10M1	15,00	A
B10M2	15,00	A
B8M2	15,00	A
B6M3	13,33	A B
B2M1	13,33	A B
B5M3	11,67	A B C
B8M3	11,67	A B C
B4M1	11,67	A B C
B4M3	11,67	A B C
B5M1	11,67	A B C
B1M1	10,00	A B C D
B5M2	8,33	B C D
B3M3	8,33	B C D
B4M2	8,33	B C D
B6M1	6,67	C D
B2M2	5,00	D
B2M3	5,00	D
B3M2	5,00	D
B6M2	5,00	D
B1M2	5,00	D
B1M3	5,00	D

La prueba de Tukey al 5% para tratamientos en la variable crecimiento bacteriano (Tabla 9) presenta cuatro rangos de significación, en el primer rango se encuentran los tratamientos comprendidos entre B9M1 y B8M2 con un valor promedio compartido

de 15,00 que indica un máximo crecimiento de la bacteria en medio sólido, mientras que los tratamientos comprendidos entre B2M2 y B1M3 se ubicaron en último lugar de la prueba con un valor compartido de 5,00 que indica poco o escaso crecimiento bacteriano en el medio sólido.

TABLA 10. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA CEPAS BACTERIANAS EN LA VARIABLE CRECIMIENTO BACTERIANO

Cepas bacterianas	Medias	Rango
B9	15,00	A
B7	15,00	A
B10	15,00	A
B8	13,89	A
B5	10,56	B
B4	10,56	B
B3	9,44	B C
B6	8,33	B C D
B2	7,78	C D
B1	6,67	D

Efectuada la prueba de Tukey al 5% (Tabla 10), para cepas bacterianas en la variable crecimiento bacteriano en medio sólido, se registraron cuatro rangos de significación, con un valor compartido de 15,00 se encuentran en el primer rango de esta prueba las cepas bacterianas B9, B7, B10 que fueron las que mejor crecieron en medio sólido, mientras que la cepa bacteriana B1 presenta un menor crecimiento en medio sólido con un valor de 6,67.

TABLA 11. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA METALES PESADOS EN LA VARIABLE CRECIMIENTO BACTERIANO

Metales pesados	Medias	Rango
M1	12,83	A
M3	11,17	B
M2	9,67	C

La prueba de Tukey al 5% (Tabla 11), para metales pesados en la variable crecimiento bacteriano en medio sólido presenta tres rangos de significación, en primer lugar se encuentra M1 (control), con un promedio de 12,83, mientras que el último lugar lo ocupa el metal pesado M2 (Cu) con un valor de 9,67.

Evaluados los resultados del crecimiento bacteriano y que cada bacteria fue sembrada en medio PDA (M1), que sirvió como control, para la comparación del crecimiento sobre medio PDA que fue suplementado con sulfato de cobre pentahidratado (M2) y PDA suplementado con cloruro de cadmio (M3), permiten afirmar que, las bacterias BUTA13, BUTA16 y BUTA19 resisten a 2 mM de Cu y Cd, mientras que la bacteria BUTA15 solamente resiste a 2 mM de Cu. De acuerdo con los razonamientos que se han venido realizando, probablemente las especies bacterianas están codificadas por un gen que indica la resistencia al metal pesado y así transportaron la concentración de los metales utilizados en éste experimento como fuente de carbono para su metabolismo. Lo anotado corrobora el ensayo realizado por Shamin et al. (2014), quienes mencionan que en algunas bacterias, la resistencia está codificada por plásmidos que puede conducir a la absorción de Cd intracelular. Sin embargo, algunas bacterias Gram negativas sin plásmidos son tan resistentes al Cd como son bacterias que contienen plásmidos que codifican para la resistencia a Cd.

Además Bhattacharya y Gupta (2013), menciona que el cobre es un oligoelemento esencial y que también en concentraciones altas es un metal pesado altamente tóxico, determinados géneros bacterianos o especies resistentes a cobre son codificadas por plásmidos para integrar el cobre al metabolismo celular y se pueden utilizar para el tratamiento de aguas residuales ricas en cobre. Esto indica la capacidad potencial de biosorción de estas cepas para eliminar los metales pesados de las aguas residuales usadas para riego.



### 5.1.5. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio líquido

#### 5.1.5.1. Absorbancia

TABLA 12. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE ABSORBANCIA (595 nm)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F
Tratamientos	29	7,85	0,27	96,03 **
Cepas bacterianas (B)	9	1,55	0,17	61,23 **
Metales pesados (M)	2	4,77	2,38	845,58 **
B*M	18	1,53	0,08	30,15 **
Error	60	0,17	0,0028	
Total	89	8,02		

Media= 0,325

Coefficiente de variación= 16,31%

\*\*= altamente significativo

Los valores correspondientes a la variable absorbancia se reportan en el (Anexo 6). El análisis de varianza (Tabla 12) determinó que existen diferencias estadísticas altamente significativas para tratamientos, cepas bacterianas, metales pesados y la interacción de cepas bacterianas y metales pesados. El coeficiente de variación fue del 16,31 % y la media tuvo un valor de 0,325.

La prueba de Tukey al 5% (Tabla 13), para tratamientos en la variable absorbancia presenta once rangos de significación, presenta en el primer lugar el tratamiento B9M1 con un valor de absorbancia de 0,98, mientras que el tratamiento B7M3 se ubicó en último lugar con un valor de 0.01 que indica poco o escaso crecimiento bacteriano en el medio líquido.

TABLA 13. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA TRATAMIENTOS EN LA VARIABLE ABASORBANCIA (595 nm)

Tratamientos	Medias	Rangos
B9M1	0,98	A
B10M1	0,89	A B
B6M1	0,78	B C
B9M3	0,73	B C D
B7M1	0,70	C D
B1M1	0,68	C D E
B8M1	0,62	C D E F
B3M1	0,60	D E F
B4M1	0,51	E F G
B10M3	0,50	F G
B5M1	0,49	F G
B8M3	0,36	G H
B3M2	0,29	H I
B2M1	0,26	H I J
B7M2	0,17	I J K
B2M2	0,17	I J K
B1M2	0,15	I J K
B10M2	0,13	I J K
B5M2	0,13	I J K
B8M2	0,12	I J K
B6M2	0,12	J K
B4M2	0,12	J K
B9M2	0,12	J K
B2M3	0,03	K
B3M3	0,03	K
B1M3	0,02	K
B4M3	0,02	K
B5M3	0,02	K
B6M3	0,02	K
B7M3	0,01	K

TABLA 14. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA CEPAS BACTERIANAS EN LA VARIABLE ABSORBANCIA (595 nm)

Cepas bacterianas	Medias	Rango
B9	0,61	A
B10	0,51	B
B8	0,37	C
B3	0,31	C D
B6	0,31	C D
B7	0,30	C D E
B1	0,28	D E F
B4	0,22	E F G
B5	0,21	F G
B2	0,15	G

Efectuada la prueba de Tukey al 5% (Tabla 14), para cepas bacterianas en la variable abasorbancia, se registraron siete rangos de sinificación, en el primer rango se encuentra la cepa bacteriana B9 con un valor de 0,61 que fue la que mayor resistencia tubo, mientras que la cepa bacteriana B2 presenta una menor resistencia con un valor de absorbancia de 0,15.

TABLA 15. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA METALES PESADOS EN LA VARIABLE ABSORBANCIA (595 nm)

Metales pesados	Medias	Rango
M1	0,65	A
M3	0,17	B
M2	0,15	B

La prueba de Tukey al 5% (Tabla15), para metales pesados en la variable absorbancia presenta dos rangos de significación, en primer lugar se encuentra M1 (control), con un promedio de 0,65, en segundo lugar se encuentra el metal pesado M3 (Cd) con un promedio de 0,17, mientras que el ultimo lugar lo ocupa el metal pesado M2 (Cu) con un valor de 0,15.

Los resultados obtenidos permite deducir que, las bacterias BUTA16 y BUTA19 tuvieron mayor crecimiento en la presencia del metal Cd y la bacteria que menos creció a la presencia del metal Cd fueron la bacteria BUTA13. Cabe agregar, que la mayoría

de bacterias Gram negativas y Gram positivas presentan naturalmente ADN que se encuentran en la forma de elementos extracromosómicos, autorreplicativos, denominados plásmidos, que se heredan de forma estable. Estos elementos pueden codificar funciones no esenciales para las células como lo es la resistencia a metales pesados, y así probablemente puedan ser capaces de concentrar especies de metales de soluciones acuosas y acumularlas dentro de su estructura celular como fuente de carbono y nitrógeno.

Madigan y Martinko (2005), manifiestan que algunas bacterias producen pigmentos que actúan como sideróforos que son moléculas secretadas por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro para secuestrar el hierro en su entorno y que son sintetizadas principalmente por bacterias Gram negativas. Presentan una amplia versatilidad metabólica que se traduce en su capacidad para utilizar sustratos muy variados como fuente de carbono, dicha versatilidad se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles o unidades genéticas funcionales para la síntesis de enzimas específicas las cuales permiten catabolizar los compuestos presentes en el medio, debido a ello, las bacterias resistentes a metales pesados son capaces de colonizar un amplio rango de nichos contaminados.

Díaz (2011), define que por medio de la espectrofotometría, se permite realizar ensayos microbiológicos trabajando de manera necesaria bajo condiciones equivalentes con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar, las bacterias absorben y dispersan la luz transmitida, la cual es medida a una frecuencia fija, registrando así, los cambios turbidimétricos de un medio de cultivo líquido al relacionarlo con el control estéril y registrando en el espectrofotómetro como absorbancia (A). Un cultivo de microorganismos en un medio líquido, actúa como una suspensión coloidal, bloqueando y reflejando la luz que pasa a través de él, siendo la luz absorbida directamente proporcional a la concentración de células existentes en el cultivo pero la absorbancia no es una medida directa del número de células. También, Matheus et al. (2016), indican que la espectrofotometría es un método confiable para asegurar la presencia de bacterias, pero no es capaz de diferenciar entre cepas. La Espectrofotometría UVvisible resulta ser un método menos sensible que la siembra por estrías en medio sólido, lo que se debe a que cuando el número de colonias es muy alto, la turbidez de la muestra, no permite medir la absorbancia con precisión. Sin

embargo, la técnica espectrofotométrica es un método más sencillo, rápido y económico.

## **5.2. Verificación de la hipótesis**

El análisis de crecimiento de bacterias en medio sólido y líquido de bacterias aisladas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Amabato en presencia de 2 mM de Cu y Cd, para el análisis de varianza, el valor p calculado es menor a 0,05, es decir altamente significativo; por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa la cual indica que existen bacterias resistentes a la presencia de 2 mM de Cu y Cd.

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS**

#### **6.1. CONCLUSIONES**

- Las bacterias aisladas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato presentan una amplia resistencia a cobre y cadmio en concentraciones de 2 mM. Las bacterias BUTA13, BUTA15, BUTA16 Y BUTA19 presentaron un amplio rango de resistencia a Cu. En cuanto a las bacterias BUTA13, BUTA16 y BUTA19 presentaron un amplio rango de resistencia a Cd.
- El análisis fisicoquímico del agua del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato indica que la cantidad de Cu y Cd, así como para otros metales pesados se encuentra dentro de los parámetros permisibles para aguas de uso agrícola, siendo para Cu 0,007 mg/l y para Cd <0,0008 mg/l, con el tiempo las concentraciones de los metales pesados se va acumulando en el suelo y pudiendo ocasionar problemas en los cultivos.
- Se evaluó la resistencia de cepas bacterianas a metales pesados en medio de cultivo sólido y líquido, dando como respuesta positiva el crecimiento en presencia de 2 mM de Cu y Cd las bacterias BUTA13, BUTA15, BUTA16 y BUTA19, y así presentando mayor capacidad potencial para posibles usos en biorremediación de metales pesados.

## 6.2. BIBLIOGRAFÍA

Agudelo, L. et al., (2012). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista LASALLISTA de Investigación*. 2 (1),57-60.

Alanis, E. (2004). *Pseudomonas* en Biotecnología. *Rev. Biotecnologica*. 9 (1), 30-34.

Alarcon, A, y Ferrera, R. (2013). Biorremediación de Suelos y Aguas contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambie*. 31 (2), 211-212.

Aleman, J. (2004). Tratamiento físico químico compacto de aguas residuales. *Revista Ambientum*.

Arellano, D, y Yambay, C. (2016). Caracterización de cepas bacterianas aisladas a partir de suelos, con potencial para degradar pcb's presentes en aceites dieléctricos provenientes de la central hidroeléctrica "ALAO" de la empresa eléctrica riobamba S A (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Arrieta, O, et al., (2012). Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Revista Gestión y Ambiente*. 15 (1), 27-39.

Bhattacharya, A, y Gupta, A. (2013). Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy metals rich industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*. 20 (9), 6628-6637

Bonet, C, y Calzadilla, R. (2011). Calidad del agua de riego y su posible efecto en los rendimientos agrícolas en la Empresa de Cultivos Varios Sierra de Cubitas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 20 (3), 19-23

Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42, 131-143

Carballo, M. (2012). Capacidad de captura de cadmio y cinc por bacterias, microalgas y levaduras. *Revista Cubana de Ciencias biológicas*. 1 (1), 34-43

Carreño, U. (2015). Industrial water treatment with heavy metals through zeolites and bioremediation systems. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*. 15 (1), 70-78

Di Paola, M, y Vicién, C. (2010). Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación. *CEUR-COCINET*. 6-7.

Díaz, C. (2011). Caracterización Microbiológica (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Colombia.

Duque, A. (2016). Evaluación de la degradación de arsénico con cepas bacterianas aisladas de relaves mineros, en el cantón Ponce Enríquez. (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador.

El Telégrafo. (2010). Río contaminado irriga cultivos. Recuperado de: <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional-centro/1/rio-contaminado-irriga-cultivos>.

EPA. (1994). Method 200.7, Revision 4.4: Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. United States.

Fernández, L, y Padilla, S. (2013). Capacidad acumuladora de cadmio en raíces de *Scirpus californicus* expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de cadmio en condiciones de laboratorio. *Revista Reviolest*. 2 (1), 16-20

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2000). El riego en América Latina y El Caribe en cifras. Roma.

Gobierno Provincial de Tungurahua. (2014). Plan provincial de riego de Tungurahua.



Gómez, A. (2011). Evaluación de la actividad y la diversidad bacteriana con potencial bioremediador asociada a diferentes profundidades en el suelo del morro de Moravia mediante análisis de secuencias del Gen 16s rDNA (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.

Gonzales, E. (2011). Biodisponibilidad y fraccionamiento de metales pesados en suelos agrícolas enmendados con biosólidos de origen municipal. *Revista Scielo*. 4 (29), 292-295

Guadarrama, M, y Galván A. (2015). Impact of using wastewater in agricultura. *Revista CIBA (Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias)*. 4 (7)

Herrera, T. (2011). La contaminación con cadmio en suelos agrícolas. *Scientific Journals*. 8 (2), 42-45

INEN. (1999). Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo y reactivos. Primera edición. 1 (99), 19

Islas, M, y Bojórquez R. (2011). Bacterias reductoras de cromo y su potencial biotecnológico. *Revista Scielo*. 27 (3), 232-238.

la Hora. (2008). Peligrosas aguas del rio Cutuchi. Recuperado de: [http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/797331/1/Peligrosas\\_aguas\\_del\\_r%C3%A0Do\\_Cutuchi.html#.V5-uIfnhC1s](http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/797331/1/Peligrosas_aguas_del_r%C3%A0Do_Cutuchi.html#.V5-uIfnhC1s)

Leadbetter, E, y Poindexter J. (2013). *Bacteria in Nature*. Springer Science & Business Media. Volume 1.

Madigan, M, y Martinko, J. (2005). *Brock Biology of Microorganisms*. 11th edition. 149-152.

Marrero-Coto, J, Díaz-Valdivia, A, y Coto-Pérez, O. (2009). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 41 (1), 67-78.

Matheus, P, et al., (2016). Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta como una herramienta para estudiar el crecimiento de las cepas atcc 25922 y atcc 35218 de Escherichia coli. *Acta Bioclínica*. 6 (11), 44-57.

Méndez, F, y Gonzales, J. (2009). Evaluación de la calidad de agua de riego usada en los cultivos de arroz de la zona alta de la meseta de la ciudad de Ibagué. *Revista Dialnet*. 30 (4), 72-78.

Mendez, J, et al., (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Revista Tropical and Agrotropical Agrosistems*. 10 (1), 29-44.

Miranda, D, et al., (2008). Acumulación de metales pesados en suelo y planta de cuatro cultivos hortícolas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 2 (2), 186.

Padilla, W. (2015). Fertilización de suelos y nutrición vegetal. Curso manejo de suelos llevado a cabo en la Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

Panigatti, M, et al., (2012). Uso de Escherichia Coli para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). *Revista Redalyc*. 3 (2), 11-24.

Pozo, C. (2012). Fitorremediación de las aguas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato mediante humedales vegetales a nivel de prototipo de campo, Salcedo-Cotopaxi (Tesis maestría). Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.

Puyen, Z. (2013). Selección de microorganismos con potencial para bioreparar ambientes contaminados con metales pesados (Tesis de postgrado). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

Prieto, J, et al., (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y aguas. *Revista Redalyc*. 10 (1), 29-44.

Quinaluisa, N. (2016). Análisis de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del canal de riego Latacunga - Salcedo – Ambato (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.

Revelo, D, et al., (2015). Uso de Microorganismos Nativos en la Remoción Simultánea de Materia Orgánica y Cr (VI) en una Celda de Combustible Microbiana de Biocátodo (CCM). Revista Scielo. 26 (6), 77-88.

Rodríguez. (2016). Identificación molecular de levaduras nativas y evaluación de su capacidad biosorbente de cobre (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Salvucci, E. (2010). Seminario de crecimiento bacteriano. Llevado a cabo el 09 de abril.

SENAGUA. (2011). Calidad de agua en el Ecuador.

Shamim, S, et al. (2014). Cadmium-resistance mechanism in the bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2. PubMed. 67(2), 57.

Stevens, D, et al., (2003). Determining toxicity of lead and zinc run off in soils: salinity effects on metal partitioning and on phytotoxicity. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 3017-3024.

Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria TULAS. (2010). Libro VI, Norma de Calidad Ambiental y Descarga de Efluentes: Recurso Agua.

Vásquez, Y, et al., (2014). Evaluación de un sistema de medio fijo como soporte para una película microbiana capaz de reducir Cr (VI) de lodos residuales de curtiembres. Revista Scielo. 12 (21), 58-66

Wu, G, et al., (2014). *Enterococcus faecalis* strain LZ-11 isolated from Lanzhou reach of the Yellow River is able to resist and absorb Cadmium.

Yépez, C. (2011). Remoción de detergentes de aguas residuales empleando hongos seleccionados obtenidos a partir de efluentes de industria textil y evaluación de su tolerancia a metales pesados a nivel de laboratorio (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército. Sangolqui, Ecuador.

## 6.3. ANEXOS

### ANEXO 1. RESULTADO DEL ANALISIS FISICOQUÍMICO DEL AGUA DE RIEGO

 <p><b>CESTTA</b> SGC</p>	<p><b>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</b></p> <p><b>DEPARTAMENTO : SERVICIOS DE LABORATORIO</b></p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>	 <p>Servicio de <b>Acreditación</b> Ecuatoriano</p> <p><b>Acreditación N° OAE LE 2C 06-008</b> <b>LABORATORIO DE ENSAYOS</b></p>
--	--	---

<b>INFORME DE ENSAYO No:</b>	895
<b>ST:</b>	505 - 16 ANÁLISIS DE AGUAS
<b>Nombre Peticionario:</b>	UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
<b>Atn.</b>	Daniel Reinoso Torres
<b>Dirección:</b>	Parroquia Antonio José Holguín Salcedo - Cotopaxi
<b>FECHA:</b>	29 de Julio del 2016
<b>NUMERO DE MUESTRAS:</b>	1
<b>FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:</b>	2016/07/20 - 10:40
<b>FECHA DE MUESTREO:</b>	2016/07/19 - 10:30
<b>FECHA DE ANÁLISIS:</b>	2016/07/20 - 2016/07/29
<b>TIPO DE MUESTRA:</b>	Agua de riego
<b>CÓDIGO CESTTA:</b>	LAB-A 820-16
<b>CÓDIGO DE LA EMPRESA:</b>	NA
<b>PUNTO DE MUESTREO:</b>	Canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato
<b>ANÁLISIS SOLICITADO:</b>	Físico - Químico
<b>PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:</b>	Daniel Reinoso
<b>CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:</b>	T máx.: 25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

#### RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Cobre	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	0,0077	±20%	-
Cadmio	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,0008	±22%	-
Cromo	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,01	±17%	-
Zinc	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,05	±12%	-
Arsénico	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	0,013	±22%	-
Níquel	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	0,021	±27%	-
Aluminio	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	0,82	±7%	-
Plomo	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,005	±22%	-
Selenio	PEE/CESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,01	±18%	-

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.  
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados  
MC01-14

Página 1 de 2  
Edición 0

## ANEXO 1. CONTINUACIÓN



**CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y  
TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA  
AMBIENTAL**  
**DEPARTAMENTO :  
SERVICIOS DE LABORATORIO**  
Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias)  
RIOBAMBA - ECUADOR  
Telefax: (03) 3013183



Servicio de  
**Acreditación**  
Ecuatoriano

Acreditación N° OAE LE 2C 06-008  
LABORATORIO DE ENSAYOS

*Mercurio	EPA245.7/EPA 3015 <sup>a</sup>	mg/L	<0,001	-	-
-----------	--------------------------------	------	--------	---	---

### OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los parámetros marcados con (\*) se encuentran fuera del alcance de acreditación del SAE.

### RESPONSABLE DEL INFORME:

  
Dr. Mauricio Álvarez  
RESPONSABLE TÉCNICO



ANEXO 2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LAS COLONIAS BACTERIANAS DE ACUERDO AL MARGEN, FORMA, ELEVACIÓN, SUPERFICIE Y CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS.

CEPA BACTERIANA	MARGEN	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS
BUTA4	Erosionado	Irregular	Plana	Lisa	Opaca
BUTA5	Entero	Circular	Plana	Lisa	Opaca
BUTA6	Entero	Circular	Convexa	Lisa	Opaca
BUTA7	Entero	Circular	Convexa	Rugosa	Opaca
BUTA9	Lobulado	Irregular	Convexa	Lisa	Opaca
BUTA10	Erosionado	Irregular	Convexa	Rugosa	Opaca
BUTA13	Entero	Circular	Convexa	Lisa	Opaca
BUTA15	Entero	Circular	Convexa	Rugosa	Opaca
BUTA16	Entero	Circular	Plana	Lisa	Opaca
BUTA19	Entero	Circular	Plana	Lisa	Opaca

### ANEXO 3. TINCIÓN DE GRAM Y FORMA DE LAS BACTERIAS.

CEPA BACTERIANA	TINCIÓN DE GRAM	FORMA
BUTA4	-	Estafilococos
BUTA5	-	Diplococos
BUTA6	-	Cocos
BUTA7	-	Diplococos
BUTA9	+	Cocos
BUTA10	-	Cocos
BUTA13	-	Cocos
BUTA15	-	Cocos
BUTA16	-	Cocos
BUTA19	-	Estafilococos



ANEXO 4. CRECIMIENTO BACTERIANO EN PLACA (CUALITATIVO)

TRATAMIENTOS		REPETICIONES <sup>3</sup>		
Nº	SIMBOLO	I	II	III
1	B1M1	++	++	++
2	B1M2	+	+	+
3	B1M3	+	+	+
4	B2M1	+++	++	+++
5	B2M2	+	+	+
6	B2M3	+	+	+
7	B3M1	+++	+++	+++
8	B3M2	+	+	+
9	B3M3	++	++	+
10	B4M1	++	++	+++
11	B4M2	+	++	++
12	B4M3	+++	++	++
13	B5M1	++	++	+++
14	B5M2	+	++	++
15	B5M3	+++	++	++
16	B6M1	+	++	+
17	B6M2	+	+	+
18	B6M3	+++	+++	++
19	B7M1	+++	+++	+++
20	B7M2	+++	+++	+++
21	B7M3	+++	+++	+++
22	B8M1	+++	+++	+++
23	B8M2	+++	+++	+++
24	B8M3	++	+++	++
25	B9M1	+++	+++	+++
26	B9M2	+++	+++	+++
27	B9M3	+++	+++	+++
28	B10M1	+++	+++	+++
29	B10M2	+++	+++	+++
30	B10M3	+++	+++	+++

<sup>3</sup> += 5  
 ++= 10  
 +++= 15

ANEXO 5. CRECIMIENTO BACTERIANO EN PLACA (CUANTITATIVO)

TRATAMIENTOS		REPETICIONES			TOTAL	MEDIA
Nº	SIMBOLO	I	II	III		
1	B1M1	10	10	10	30	10,00
2	B1M2	5	5	5	15	5,00
3	B1M3	5	5	5	15	5,00
4	B2M1	15	10	15	40	13,33
5	B2M2	5	5	5	15	5,00
6	B2M3	5	5	5	15	5,00
7	B3M1	15	15	15	45	15,00
8	B3M2	5	5	5	15	5,00
9	B3M3	10	10	5	25	8,33
10	B4M1	10	10	15	35	11,67
11	B4M2	5	10	10	25	8,33
12	B4M3	15	10	10	30	10,00
13	B5M1	5	10	15	30	10,00
14	B5M2	5	10	10	25	8,33
15	B5M3	15	10	5	30	10,00
16	B6M1	5	10	5	20	6,67
17	B6M2	5	5	5	15	5,00
18	B6M3	15	15	5	35	11,67
19	B7M1	15	15	15	45	15,00
20	B7M2	15	15	15	45	15,00
21	B7M3	15	15	15	45	15,00
22	B8M1	15	15	15	45	15,00
23	B8M2	15	15	15	45	15,00
24	B8M3	10	15	10	35	11,67
25	B9M1	15	15	15	45	15,00
26	B9M2	15	15	15	45	15,00
27	B9M3	15	15	15	45	15,00
28	B10M1	15	15	15	45	15,00
29	B10M2	15	15	15	45	15,00
30	B10M3	15	15	15	45	15,00

## ANEXO 6. ABSORBANCIA (595nm)

TRATAMIENTOS		REPETICIONES			TOTAL	MEDIA
N°	SIMBOLO	I	II	III		
1	B1M1	0,663	0,465	0,898	2,026	0,675
2	B1M2	0,188	0,119	0,148	0,455	0,152
3	B1M3	0,024	0,020	0,022	0,066	0,022
4	B2M1	0,219	0,277	0,270	0,766	0,255
5	B2M2	0,172	0,182	0,149	0,503	0,168
6	B2M3	0,016	0,030	0,052	0,098	0,033
7	B3M1	0,574	0,606	0,627	1,807	0,602
8	B3M2	0,335	0,209	0,329	0,873	0,291
9	B3M3	0,042	0,027	0,022	0,091	0,030
10	B4M1	0,472	0,527	0,541	1,54	0,513
11	B4M2	0,118	0,118	0,121	0,357	0,119
12	B4M3	0,018	0,021	0,024	0,063	0,021
13	B5M1	0,480	0,489	0,498	1,467	0,489
14	B5M2	0,130	0,123	0,124	0,377	0,126
15	B5M3	0,026	0,022	0,012	0,06	0,020
16	B6M1	0,884	0,754	0,714	2,352	0,784
17	B6M2	0,079	0,114	0,168	0,361	0,120
18	B6M3	0,013	0,010	0,022	0,045	0,015
19	B7M1	0,710	0,636	0,751	2,097	0,699
20	B7M2	0,225	0,103	0,193	0,521	0,174
21	B7M3	0,011	0,010	0,016	0,037	0,012
22	B8M1	0,631	0,615	0,606	1,852	0,617
23	B8M2	0,111	0,154	0,105	0,370	0,123
24	B8M3	0,390	0,356	0,328	1,074	0,358
25	B9M1	0,995	0,948	0,991	2,934	0,978
26	B9M2	0,130	0,117	0,105	0,352	0,117
27	B9M3	0,745	0,721	0,725	2,191	0,730
28	B10M1	0,907	0,892	0,878	2,677	0,892
29	B10M2	0,114	0,139	0,130	0,383	0,128
30	B10M3	0,478	0,428	0,589	1,495	0,498

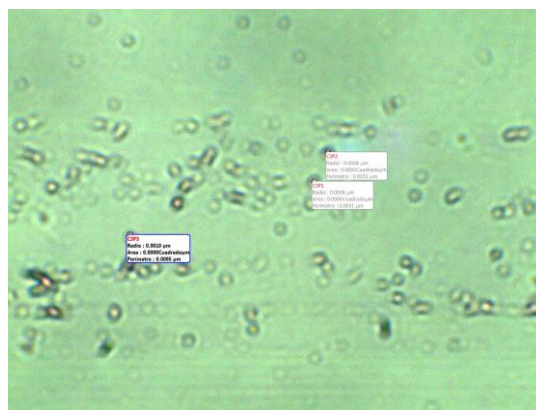
## ANEXO 7. FOTOGRAFÍAS



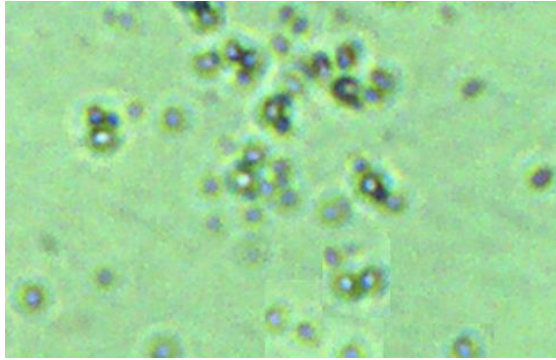
Recolección de muestra de agua



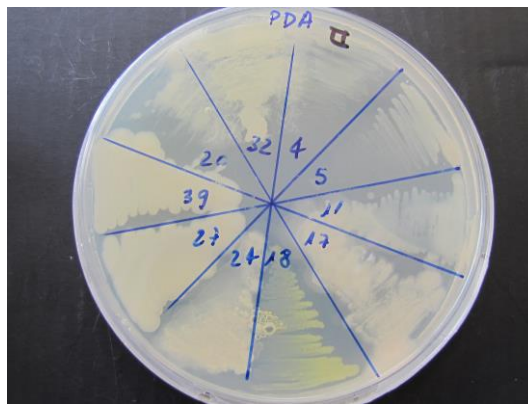
Ensayo en el laboratorio



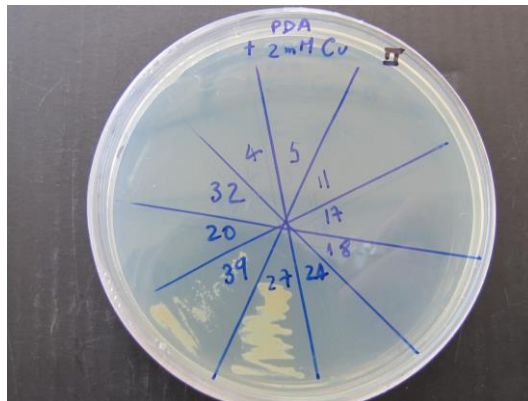
Tinción de Gram de la BUTA15



Tinción de Gram de la BUTA9



Crecimiento de bacterias en PDA



Crecimiento de bacterias en PDA más 2mM Cu

## **CAPÍTULO VII**

### **PROPUESTA**

#### **7.1. DATOS INFORMATIVOS**

##### **7.1.1. Título**

Protocolo para el estudio de cepas bacterianas autóctonas del banco de microorganismos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, con potencial de resistencia a metales pesados.

##### **7.1.2. Institución ejecutora**

Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias Agropecuarias.

##### **7.1.3. Beneficiarios**

Investigadores y estudiantes de Universidades del Ecuador. Centros de Investigaciones en Biotecnología. Empresas privadas relacionadas a Agrobiotecnología.

##### **7.1.4. Ubicación**

Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias Agropecuarias.  
Cantón Cevallos, sector Querochaca.

##### **7.1.5. Tiempo estimado para la ejecución**

Doce meses.

### **7.1.6. Equipo técnico responsable**

Docentes investigadores y estudiantes interesados en investigar sobre los microorganismos útiles en biotecnología.

## **7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA**

Esta propuesta se plantea en relación a los resultados del trabajo de investigación para continuar los estudios con el resto de cepas bacterianas que fueron previamente aisladas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato y que se encuentran en el banco de microorganismos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

El estudio de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradadores, esta creciendo notablemente en el área de la ecología microbiana, lo cual ha permitido profundizar en el conocimiento acerca de la composición de las comunidades presentes en aguas, suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación, para determinar microorganismos capaces de adaptarse y de explorar los hábitats contaminados. Así mismo, teniendo en cuenta que el metabolismo de sustratos orgánicos en sistemas naturales se produce mediante interacciones metabólicas complejas con la participación de microorganismos diferentes, es necesario estudiar las poblaciones microbianas presentes en el agua, suelo de la forma más representativa posible.

## **7.3. JUSTIFICACIÓN**

Se conoce que ciertos microorganismos tiene la capacidad de crecer a partir de sustancias nocivas para el medio ambiente y lo degradan, por tal motivo, una de las soluciones al problema de la contaminación de aguas y suelos por metales pesados constituye la implementación de técnicas de remediación biológica como la biorremediación; cuyo fin es la degradación o transformación de contaminantes en compuestos o elementos menos peligrosos o no peligrosos, utilizando las microorganismos como bacterias, hongos e incluso algas. Dicha técnica comprende métodos seguros y menos costos en comparación con otros procesos de remediación

químicos y/o físicos de el tratamiento de residuos como la incineración, la extracción de vapor, la desorción térmica, el lavado de suelos y el empleo de rellenos sanitarios.

#### **7.4. OBJETIVO**

Complementar los estudios de resistencia bacteriana a metales pesados utilizando microorganismos autóctonos del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato, enfatizando en las cepas BUTA13, BUTA15, BUTA16 Y BUTA19, del banco de microorganismos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

#### **7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

La viabilidad de la propuesta “Resistencia bacteriana a metales pesados utilizando cepas bacterianas autóctonas presentes en el banco de microorganismos de la Facultad e Ciencias Agropecuarias” se asegura con los resultados obtenidos en la investigación “Evaluación de cepas bacterianas resistentes a metales pesados en la zona del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato con potencial biorremediador”, Por ende el cumplimiento de los objetivos específicos dará como resultado el cumplimiento del objetivo general. Además, los resultados de la investigación en la cual se fundamenta la presente propuesta, permitirán que los resultados finales sean obtenidos sin ninguna clase de inconveniente.

#### **7.6. FUNDAMENTACIÓN**

La falta de conocimientos de nuevas técnicas de remediación biológicas de metales pesados, ha sido determinante para aislar microorganismos autóctonos que puedan ser capaces de crecer en medios de contaminación altas, siendo así que en la actualidad, las investigaciones en biorremediación están siendo una prioridad para resolver problemas de contaminación de metales pesados.



## **7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO**

### **7.7.1. Crecimiento de bacterias**

Las bacterias serán sembradas en medio de cultivo PDA (Difco TM), mediante una estria simple y se dejara crecer en una incubadora por un tiempo de 48 horas a 29°C ( $\pm 1$  °C).

### **7.7.2. Prueba de tinción de Gram**

Para realizar esta prueba se utilizaran los siguientes materiales: violeta de genciana o cristal violeta, lugol, alcohol cetona, safranina, agua destilada, biomasa de bacterias, porta objetos y un microscopio.

Para aprovechar la identificación bacteriana se puede realizar pruebas que se utilizan en la identificación preliminar, con lectura inmediata: (catalasa, oxidasa).

### **7.7.3. Resistencia de bacterias a Cu y Cd en medio sólido**

Para observar el impacto que la concentración metálica tiene sobre el crecimiento bacteriano se realizará el siguiente protocolo: se realizará un medio de cultivo PDA (39 g PDA Difco TM en 1000 ml de agua destilada) suplementadas con sales metálicas de Cu ( $\text{CuSO}_4$ ) y Cd ( $\text{CdCl}_2$ ) a una concentración final de 2mM, como control se utilizara medio PDA sin adición de metal pesado y posteriormente, con ayuda de un asa estéril las cepas bacterianas previamente aisladas del canal Latacunga-Salcedo-Ambato, serán sembradas mediante estrías simples en cajas de Petri, luego se pondrá en una incubadora (Red Line), a una temperatura constante de 29°C ( $\pm 1$  °C), por un tiempo de 24 horas. Todos los materiales de vidrio y soluciones preparadas, serán esterilizadas en un autoclave (MIDMARK) a 126°C por tiempo de quince minutos y en el momento de trabajar en la cámara de flujo laminar (BIOBASE) se desinfectará por tiempo de diez minutos con la luz ultra violeta.

#### **7.7.4. Resistencia de bacterias a metales pesados en medio líquido**

Se Preparará caldo nutritivo (5g peptona, 3g extracto de carne en 1000ml de agua destilada), antes de introducir los materiales a la cámara de flujo laminar (BIOBASE) se desinfectará por tiempo de diez minutos con la luz ultra violeta. Después, se rotulará cuatro tubos microbiológicos como: solución madre, control, cobre y cadmio. A continuación, se agregará 2000 ul de caldo nutritivo más biomasa bacteriana en el primer tubo respectivamente rotulado, 1900 ul de caldo nutritivo más 100 ul de solución madre en el segundo tubo respectivamente rotulado, 1880 ul de caldo nutritivo más 20 ul de solución de cobre y más 100 ul de solución madre en el tercer tubo respectivamente rotulado, 1700 ul de caldo nutritivo más 200 ul de solución de cadmio y más 100 ul de solución madre en el cuarto tubo respectivamente rotulado, las cuales estarán a una concentración final de 2mM. Se dejará crecer por 48 horas a las mismas condiciones mencionadas en el ensayo anterior, transcurrido el tiempo de procederá a medir la absorbancia en el espectrofotómetro visible (GENESYS<sup>TM</sup> 20) a una longitud de onda de 595nm. Para analizar la resistencia de la bacteria se relacionaran los valores obtenidos con el control.

#### **7.8. ADMINISTRACIÓN**

Esta propuesta estará administrado por los docentes investigadores de la Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias Agropecuarias, específicamente de la carrera de Ingeniería Agronómica, quienes brindaran su ayuda y conocimientos a los estudiantes que puedan continuar con la investigación en el ámbito de la biotecnología.

#### **7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN**

Después de doce meses, se hará una evaluación de la aplicación de la propuesta en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato donde se desarrolló la investigación, para determinar la resistencia de bacterias autóctonas a los metales pesados contaminados en agua de riego, suelos y así fomentar más estudios acerca de este tema.