



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Carátula

Aislamiento e identificación de bacterias potenciales que degradan Alfa-cipermetrina y Dimetoato de suelos agrícolas con cultivos de arroz (*Oryza sativa L*) en la provincia de Los Ríos

Andrade Lugo, Nicole Carolina y Mena Jacho, Stephany de los Ángeles

Departamento de Ciencias de la vida

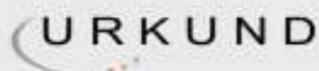
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

PhD. Jaffer Mohiddin Gooty

01 de septiembre del 2021

ANÁLISIS URKUND



Urkund Analysis Result

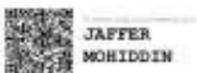
Analysed Document: Tesis Nicole Andrade, Stephany Mena.docx (D111852053)
 Submitted: 8/31/2021 12:22:00 AM
 Submitted By: neiramosquera@uteq.edu.ec
 Significance: 4 %

Sources included in the report:

tesis.docx (D14554426)
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342008000100011&lng=es&tng=esEsa
<http://www.utn.edu.ec/ficayaemprende/?tag=suelos&print=print-search>
<https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5041/1/T-UTEQ-015.pdf>
<https://docplayer.es/amp/164089791-Facultad-de-ingenieria-y-ciencias-aplicadas-evaluacion-de-la-capacidad-de-microorganismos-edaficos-para-degradar-pesticidas-lorsban-480-autora.html>
<http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/4870/1/236T0172.pdf>
https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1000&context=ing_ambiental_sanitaria
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24432/1/Tesis-143%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20448.pdf>
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/544/1/T-ESPE-029619.pdf>
<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/COBO%20ARREAGA%20REBECA%20GRACIELA.pdf>
<https://repositorio.usm.cl/bitstream/handle/11673/43374/3560900255036UTFSM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Instances where selected sources appear:

17



Jaffer Mohiddin Gooty, Ph.D.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "***Aislamiento e identificación de bacterias potenciales que degradan Alfa-cipermetrina y Dimetoato de suelos agrícolas con cultivos de arroz (Oryza sativa L) en la provincia de Los Ríos***" fue realizado por las señoritas ***Andrade Lugo, Nicole Carolina y Mena Jacho, Stephany de los Ángeles*** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 01 de septiembre del 2021

Firma:



Jaffer Mohiddin Gooty, Ph.D.

CC:1757333107



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotras, **Andrade Lugo Nicole Carolina** y **Mena Jacho Stephany de los Ángeles**, con cédulas de ciudadanía 2350489254 y 0504072224, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación ***“Aislamiento e identificación de bacterias potenciales que degradan Alfacipermetrina y Dimetoato de suelos agrícolas con cultivos de arroz (Oryza sativa L) en la provincia de Los Ríos”*** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 01 de septiembre del 2021

Firmas:

Nicole Carolina Andrade Lugo

C.C 2350489254

Stephany de los Ángeles Mena Jacho

C.C 0504072224



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotras, **Andrade Lugo Nicole Carolina y Mena Jacho Stephany de los Ángeles**, con cédulas de ciudadanía 2350489254 y 0504072224, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: ***“Aislamiento e identificación de bacterias potenciales que degradan Alfa-cipermetrina y Dimetoato de suelos agrícolas con cultivos de arroz (Oryza sativa L) en la provincia de Los Ríos”*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo, 01 de septiembre del 2021

Firmas:

Andrade Lugo Nicole Carolina

CC 05040072224

Mena Jacho Stephany de los Ángeles

C.C 0504072224

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada a Dios, por darnos la fortaleza y sabiduría para culminar exitosamente todos los procesos desarrollados y poder cumplir una meta más en nuestras vidas.

A nuestros padres, Luis Andrade, Ana Lugo, Euro Mena y Nancy Jacho por su apoyo incondicional tanto económico como emocional, ya que gracias a su esfuerzo, paciencia y perseverancia a través de los años, hoy culminamos la carrera profesional.

A nuestros hermanos, Luis Andrade, Raquel Andrade, Cristina Andrade, Karina Mena y Shirley Mena, por haber sido participes de nuestra vida, ayudarnos a crecer e impulsarnos a cumplir nuestros sueños a pesar de las adversidades.

Al resto de amigos y familiares por sus constante motivación y buenos augurios para desempeñar nuestro mejor esfuerzo.

Stephany y Nicole

AGRADECIMIENTO

Primeramente, queremos agradecer a Dios por brindarnos la vida, la fortaleza y sabiduría para culminar esta investigación tan importante para nosotras. Agradecer también a cada uno de los integrantes de nuestra familia por su indispensable apoyo moral y emocional, que nos permitió concluir esta tesis.

De igual manera agradecemos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por brindarnos los recursos y conocimientos para hoy culminar una etapa de nuestras vidas, agradecemos también a nuestro tutor de tesis, el Dr Jaffer Gooty por confiar en nosotras para desarrollar este tema tan interesante. A la Ing. Katy Medina, al Dr. Santiago Ulloa y al Dr. Armando Reyna por brindarnos facilidad de acceso a los laboratorios, estar disponibles para cualquier duda y por el incondicional apoyo moral e institucional necesario para desarrollar el tema; además, queremos brindar un agradecimiento especial al Dr. Roman Rodriguez por facilitarnos el espectrofotómetro de la ESPE Sede Latacunga y poder obtener los resultados requeridos para esta investigación.

Adicionalmente, queremos agradecer a Jorge Borrero y Alex Chimbo por haber estado presentes en las buenas y malas situaciones que se desarrollaron durante el transcurso de esta tesis; además de ser un pilar fundamental en nuestras vidas, nos brindaron apoyo para lidiar con el estrés y enfocarnos en culminar la investigación de forma exitosa.

Para finalizar queremos agradecer a nosotras mismas, por haber sido perseverantes y capaces de superar todas las situaciones adversas que se presentaron durante el estudio realizado, por haber sido colegas y amigas comprometidas con la ciencia y así poder salir adelante con un triunfo inminente.

Stephany y Nicole.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Carátula	1
Análisis Urkund	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de contenido	8
Índice de figuras.....	11
Índice de tablas.....	12
Resumen.....	13
Abstract	14
Capítulo I: Introducción.....	15
Formulación del problema	15
Objetivos de la investigación	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos	16
Marco teórico	16
Suelo	16
Microflora del suelo	17
Aislamiento e identificación de microorganismos	18
Tinción Gram.	18
Pruebas bioquímicas	19
Microorganismos con capacidad biorremediativa	20
Cultivo de arroz	20
Pesticidas	21
Alfa cipermetrina	21
Dimetoato	21

Capítulo II: Materiales y métodos.....	23
Área de estudio.....	23
Materiales y reactivos	24
Enriquecimiento y aislamiento de bacterias que degradan los pesticidas dimetoato y alfa cipermetrina	24
Muestreo	24
Enriquecimiento bacteriano	25
Procesamiento de las muestras	25
Aislamiento bacteriano.....	26
Selección de bacterias degradadoras de pesticidas.....	26
Identificación bacteriana.....	26
Identificación fenotípica	26
Identificación molecular	27
Evaluación del potencial degradador de las bacterias seleccionadas.....	27
Análisis estadístico	28
Capítulo III: Resultados.....	30
Aislamiento y purificación de microorganismos.....	30
Selección de bacterias con mayor potencial degradador	30
Pruebas de identificación bacterianas	31
Identificación fenotípica	31
Identificación molecular	33
Evaluación de la degradación de los pesticidas alfa-cipermetrina y dimetoato	34
Capítulo IV: Discusión.....	40
Enriquecimiento y aislamiento de bacterias que degradan los pesticidas alfa-cipermetrina y dimetoato	40
Selección de bacterias degradadoras de pesticidas.....	40
Identificación bacteriana.....	41

Degradación de los pesticidas alfa-cipermetrina y dimetoato	42
Capítulo V: Conclusiones	43
Capítulo VI: Recomendaciones	44
Capítulo VII: Bibliografía.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferencias estructurales entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.	19
Figura 2: Clasificación de los pesticidas según la composición químicas.	22
Figura 3: Ubicación geográfica del laboratorio	23
Figura 4: Cepas bacterianas tolerantes al plaguicida alfacipermetrina y dimetoato	30
Figura 5: Cepas bacterianas con mayor capacidad de tolerancia a plaguicidas.....	31
Figura 6: Bacterias teñidas por Tinción de Gram	32
Figura 7: Prueba bioquímica de Catalasa.....	33
Figura 8: Efecto del factor plaguicida sobre las variables crecimiento y degradación	35
Figura 9: Efecto del factor concentración sobre las variables crecimiento y degradación.....	36
Figura 10: Efecto de la interacción Plaguicida*Concentración en la variable crecimiento	37
Figura 11: Efecto de la interacción Plaguicida*Concentración en la variable degradación.....	38
Figura 12: Curva de crecimiento bacteriano	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Algunos microorganismos biorremediadores.....	20
Tabla 2: Insecticidas usados en el cultivo de arroz.....	22
Tabla 3: Ubicación política de la zona donde se llevó a cabo el estudio	23
Tabla 4: Instrumentos del laboratorio y reactivos empleados	24
Tabla 5: Componentes del Medio Mineral de Sales Minerales MSM	25
Tabla 6: Factores y niveles del diseño de Parcelas sub sub divididas.....	28
Tabla 7: Tratamientos a evaluar para determinar el crecimiento bacteriano y degradación	28
Tabla 8: Análisis de varianza para la determinación de crecimiento bacteriano y degradación ..	29
Tabla 9: Características macroscópicas de las cepas tolerantes a plaguicidas	32
Tabla 10: Caracterización bioquímica.....	32
Tabla 11: Análisis de varianza para la variable crecimiento	34
Tabla 12: Análisis de varianza para la variable degradación.....	34
Tabla 13: Comparación de medias Tukey $>0,05$ para el factor plaguicida.....	35
Tabla 14: Comparación de medias Tukey $>0,05$ para el factor concentración	36
Tabla 15: Comparación de medias Tukey $>0,05$ para la interacción plaguicida*concentración....	36

Resumen

La producción agrícola tiene como finalidad producir alimentos, para la comercialización en mercados locales y nacionales. Los agricultores aplican pesticidas por la necesidad de proteger sus cultivos, sin tomar en cuenta la toxicidad del producto que conlleva a la contaminación por residuos químicos a los cultivos, lo cual repercute en el suelo. La necesidad de restaurar los suelos en muchas zonas de cultivo mediante biorremediación se ha vuelto el enfoque actual de la biotecnología ambiental y microbiología mediante el empleo de microorganismos que remedien los daños ocasionados. Considerando que el arroz es uno de los cultivos más popularizados es de suma importancia realizar estudios sobre la contaminación de dichos suelos con el fin de mejorar y remediar sus propiedades para evitar su degeneración. Por este motivo, este estudio tuvo como objetivo principal la selección y caracterización de bacterias con mejor potencial degradador de Alfa cipermetrina y Dimetoato, los cuales constituyen parte de la lista de insecticidas más comercializados en la provincia. Para la obtención de cepas tolerantes se aisló las mismas de muestras de suelo de cultivos de arroz que habían recibido continuas aplicaciones de los plaguicidas. Se obtuvo seis cepas de las cuales cuatro (C1AI, C2AI, C1DI y C2DI) presentaron un mejor nivel de tolerancia. La caracterización bioquímica mostró que sólo dos aislamientos fueron positivos para catalasa (C1AI y C2DI), todas las cepas fueron bacilos Gram negativos, y se identificaron como *Delftia sp.*, *Sphingobium sp* y *Novosphingobium aromaticivorans*. El crecimiento bacteriano y degradación aumentó a medida que las concentraciones de ambos pesticidas aumentaron de 0 a 600 ppm tanto en cultivo sólido como líquido en todas las cepas. Se halló que el tipo de plaguicida y la concentración afectaron la capacidad de crecimiento y mineralización de los pesticidas, obteniendo mejores resultados con alfa cipermetrina que mostró la tasa de eliminación más alta de 3,608% a 96 h en concentraciones de 600 ppm.

Palabras clave:

- **BIODEGRADACIÓN**
- **ALFA CIPERMETRINA**
- **DIMETOATO**
- **CULTIVO DE ARROZ**
- **BIORREMEDIACIÓN**

Abstract

Agricultural production is intended to produce food, for commercialization in local and national markets. Farmers apply pesticides out of the need to protect their crops, without considering the toxicity of the product that leads to contamination by chemical residues to the crops, which affects the soil. The need to restore soils in many growing areas through bioremediation has become the current focus of environmental biotechnology and microbiology with microorganisms that remedy the damage caused. Considering that rice is one of the most popular crops, it is extremely important to carry out studies on the contamination of these soils to improve and remedy their properties to prevent their degeneration. For this reason, the main objective of this study is the selection and characterization of bacteria with the best degradation potential of Alpha cypermethrin and Dimethoate, which constitute part of the list of the most commercialized insecticides in the province. To obtain tolerant strains, they were isolated from soil samples of rice crops that had received continuous applications of pesticides. Six strains were obtained, of which four (C1AI, C2AI, C1DI and C2DI) presented a better level of tolerance. The biochemical characterization showed that only two isolates were positive for catalase (C1AI and C2DI), all the strains were Gram negative bacilli, and were identified as *Delftia* sp., *Sphingobium* sp and *Novosphingobium aromaticivorans*. Bacterial growth and degradation increased as the concentrations of both pesticides increased from 0 to 600 ppm in both solid and liquid culture in all strains. It was found that the type of pesticide and the concentration affected the growth capacity and mineralization of the pesticides, obtaining better results with alpha cypermethrin, which showed the highest elimination rate of 3.608% at 96 h at concentrations of 600 ppm.

Key words:

- **BIODEGRADATION**
- **ALPHA CYPERMETHRIN**
- **DIMETOATE**
- **RICE CROPS**
- **BIOREMEDIATION**

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Los plaguicidas son compuestos químicos que se encargan de atacar a las diferentes plagas que invaden a las plantaciones agrícolas, entre los más usados se encuentran los compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, entre otros (Del Puerto, Asela, Suárez Tamayo, & Palacio Estrada, 2014).

Varias investigaciones han demostrado como los plaguicidas tienen un gran impacto ambiental y ecológico (Yaguana, Sánchez, Aguilar, & Pozo, 2019) (Devine, Eza, Ogusuku, & Furlong, 2008), usualmente los plaguicidas son absorbidos por el suelo ya sea por aplicación directa o indirecta al descender de las plantaciones, la aplicación prolongada de estos contaminantes químicos causa varias afecciones a las propiedades físico químicas y biológicas del suelo, desencadenando disminución en la fertilidad y baja producción por hectárea de terreno (Kaur, y otros, 2017).

En Ecuador el uso de plaguicidas está regulado por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIAP, quienes tienen por objetivo precautelar la seguridad humana y ambiental (Valarezo & Muñoz, 2011), sin embargo, esto no asegura la posibilidad de contaminación de agua, suelo o aire con plaguicidas de alta toxicidad. De hecho, según los datos presentados por INEC (2014), en Ecuador el 73,49% de los cultivos transitorios usan plaguicidas químicos, siendo el arroz el cultivo con mayor uso de plaguicidas extremadamente tóxicos (19,52%).

El cultivo de arroz es el segundo producto más cultivado en Ecuador, ocupa un área de 308,211 hectáreas en superficie plantada, siendo las provincias más productivas Guayas y Los Ríos (MAG, 2020). Los Ríos participa con el 22,59% de la producción nacional y en contraste presenta el rendimiento más bajo con 4.5 t/ha (MAGAP, 2020), lo cual demuestra que tras varios años de empleo constante de plaguicidas químicos el rendimiento del suelo ha ido disminuyendo, siendo un gran problema para los fluminenses que tienen como principal fuente de trabajo la agricultura.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Aislar e identificar bacterias con potencial actividad degradadora de Alfa-cipermetrina y Dimetoato provenientes de suelos agrícolas con cultivos de arroz (*Oryza sativa L*) de la provincia de Los Ríos.

Objetivos específicos

- Obtener bacterias tolerantes a Alfa – cipermetrina y Dimetoato tomando como inóculo muestras de suelo de cultivo de arroz.
- Seleccionar las bacterias con mejor potencial degradador de los plaguicidas mediante espectrofotometría.
- Identificación de las bacterias con potencial capacidad degradadora mediante inspección macro y microbiológica, tinciones diferenciales y pruebas bioquímicas.

Marco teórico

Suelo

El suelo es la capa más superficial de la biósfera terrestre, está constituido de varios elementos orgánicos e inorgánicos, como minerales, nutrientes, organismos, microorganismos, agua y algunos gases como el oxígeno y dióxido de carbono. Todos estos elementos permiten el desarrollo de actividades agrícolas y pecuarias, que junto a un buen manejo del suelo se puede maximizar la producción de alimentos (García, Ramírez, & Sánchez, 2012).

La formación del suelo se desarrolla en varios procesos físicos, químicos y biológicos; en los físicos tenemos la exposición de la superficie terrestre a varios fenómenos climáticos como lluvia, sequía, cambios de temperatura y humedad que fragmentan la roca madre en partículas de menor tamaño. Los procesos químicos involucran la acción del agua, oxígeno y dióxido de carbono en la desintegración de minerales, formación de macro y micronutrientes y la disponibilidad de compuestos orgánicos para la vegetación; y en procesos biológicos, las rutas metabólicas de plantas y microorganismos aportan con la materia orgánica necesaria para fortalecer y nutrir el suelo (UNLP, 2017).

El suelo es un recurso indispensable para el desarrollo de todos los seres vivos, permite el crecimiento de plantas, movilidad de los elementos en el ciclo biogeoquímico, es el principal reservorio de agua dulce del planeta y fuente del 95% de los alimentos. El uso del suelo se reparte principalmente en el sector agrícola, ganadero, agroforestal, forestal y de conservación (FAO, 2018). El uso de suelo en Ecuador está repartido por categorías, para el año 2020 se registró que 1 442 973 hectáreas pertenecen a cultivos permanentes y 822 516 hectáreas corresponden a cultivos transitorios; lo cual indica un gran uso del suelo en producción agrícola y la importancia de mantener la calidad y fertilidad del suelo para maximizar el rendimiento (MAG, 2020).

Microflora del suelo

La flora microbiana del suelo constituye el componente más importante de este ecosistema, debido a que los microorganismos son responsables de la dinámica de desarrollo y transformación del mismo liberando nutrientes que permiten un buen crecimiento vegetal.

La comunidad microbiana del suelo la forman hongos, algas, virus, protozoarios y especialmente bacterias y actinomicetos, los cuales permiten transformar moléculas tanto orgánicas como inorgánicas que se bien se encuentran en el suelo o se incorporan. La materia orgánica (sustancias que contienen carbón) se degrada en productos de menor peso molecular conformando el humus del suelo y generando beneficios como el incremento de la fertilidad física, química y biológica del mismo, así como también su capacidad de retención e intercambio iónico (Leyva, Zamudio, Gonzáles, & Rojas, 2015).

Si bien es cierto el dominio Bacteria, es el grupo más predominante respecto a otras especies de microorganismos en el suelo, además de ser el grupo más importante y activo durante el primero paso del compostaje y humificación. Los factores por los cuales este grupo de organismos tiende a dominar en dichos procesos es gracias a su tiempo de duplicación de corta duración y su rápida adaptación al ambiente que le permite modificar su genética para soportar incluso altas y bajas tensiones de temperatura y oxígeno (Kalil, 2007).

A través de varios estudios realizados se ha logrado dilucidar que las comunidades microbianas son consideradas factores claves para promover la degradación de plaguicidas en el suelo (Karanasios, Karpouzas, & Tsiropoulos, 2012). Se han mencionado en varios trabajos que el

uso extensivo de plaguicidas en suelos agrícolas ha inducido un cambio a nivel genético en la microflora del suelo para generar mecanismos de adaptación en suelos contaminados, lo que ha causado que estos sean responsables de su degradación en el suelo (Briceño et al, 2020).

Tales adaptaciones genéticas que han permitido dicho alcance conllevaron a la inducción de síntesis de enzimas que hidrolizan, oxidan e hidroxilan los pesticidas lo que les permite a estos organismos, debido a una prolongada exposición a los plaguicidas, desarrollar la capacidad para usar dichos compuestos tóxicos como única fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre para vivir (Delso, 2015).

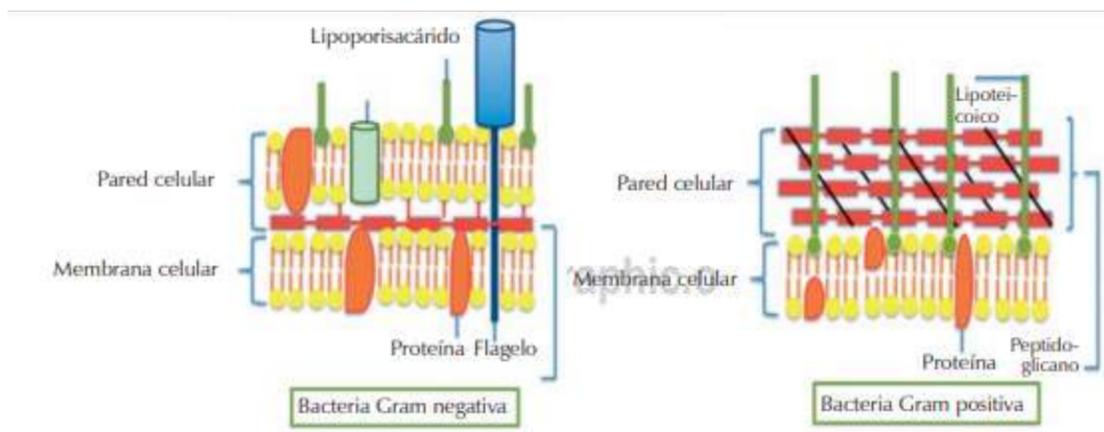
Aislamiento e identificación de microorganismos

Para la obtención, el debido aislamiento e identificación de microorganismos con capacidad biorremediativa es necesario trabajar *in vitro* bajo condiciones controladas en el laboratorio. Las cepas bacterianas con dicha capacidad provienen netamente de suelos contaminados. Muchos trabajos mencionan los parámetros ambientales que hay que tomar en cuenta para trabajar con este tipo de microorganismos, ya que estos tienden a desarrollarse en un entorno natural a ciertas condiciones de humedad, pH, nutrientes, temperatura y aireación (Uquillas, 2015).

En cuanto a la identificación a nivel microbiológico de estos organismos, se han descrito técnicas basadas tanto en la estructura de su pared celular y el tipo de reacciones enzimáticas que estos presentan al estar en contacto con diversas sustancias como lo son la Tinción de Gram y las pruebas bioquímicas.

Tinción Gram. Este tipo de técnica es definida como una tinción diferencial, debido a que permite clasificar las bacterias en Gram negativas y Gram positivas, en base a las características de la pared celular de las bacterias, la cual confiere a cada microorganismo propiedades determinantes. Las bacterias Gram negativa a diferencia de las Gram positivas tienen una fina capa de peptidoglicano la cual no logra capturar el complejo cristal violeta - yodo, haciendo que la bacteria quede de color rojo al adicionar safranina, por el contrario, si la bacteria tiene una capa gruesa de peptidoglicano esta capturaré el complejo antes mencionado por lo que quedará teñida de color morado (Esaú López-Jácome, y otros, 2013).

Figura 1: Diferencias estructurales entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.



Nota: Obtenido de (Esáú López-Jácome, y otros, 2013)

Pruebas bioquímicas. Las pruebas bioquímicas permiten determinar la actividad metabólica de una cepa pura, por lo que son empleadas principalmente para la identificación y clasificación tanto de bacterias como hongos (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).

Las pruebas utilizadas en la identificación preliminar de bacterias con lectura inmediata son:

- **Catalasa.-** La catalasa es un tipo de enzima presente en el citocromo de la mayoría de microorganismos, mediante la cual sintetizan la enzima hidrolizando el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. Esta prueba bioquímica puede permitir separar *Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. (negativa) (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010)
- **Oxidasa.-** Este tipo de reacción permite determinar la presencia de enzimas oxidasas en el microorganismo. La presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, además permite identificar bacterias aerobias de anaerobias estrictas (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).

Microorganismos con capacidad biorremediativa

La población microbiana del suelo a pesar de tener complejas interacciones y ser diversos, existen algunas que son capaces de degradar compuestos tóxicos, pero de forma selectiva, debido a que usan específicamente un sustrato contaminante. A continuación, en la tabla 1 se describen algunos de estos microorganismos usados para la descontaminación de ambientes naturales.

Tabla 1: *Algunos microorganismos biorremediadores*

Microorganismo	Sustrato que degrada
<i>Pseudomonas sp.</i>	Glifosato
<i>Agrobacterium sp.</i>	Glifosato
<i>Mycobacterium sp.</i>	Endosulfan y endosulfato
<i>Lucilia cuprina</i>	Piretroides sintéticos
<i>Sphingobium sp.</i>	Hexaclorociclohexano B
<i>Sphingomonas sp.</i>	Hexaclorociclohexano B
<i>Pseudomonas sp.</i>	Triazinas
<i>Sphingomonas sp.</i>	Hexaclorohexano

Nota: Obtenido de (Uquillas, 2015)

Cultivo de arroz

Si bien es cierto la producción arrocerá constituye uno de los pilares económicos fundamentales del Ecuador, debido a que es considerado como un país productor y consumidor de arroz. Tal motivo lo ha ubicado en el puesto 26 de los países productores de arroz según lo indica la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Cerca del 83% de los cultivos de la gramínea se encuentran en las provincias de Guayas y los Ríos (Mendoza Avilés, Loo Bruno, & Vilema Escudero, 2019).

El comercio externo de arroz no tiene una tendencia sostenida en el tiempo, ya que depende del abastecimiento interno, del precio al productor doméstico frente al pagado por las exportaciones, la situación de oferta en los países vecinos, y las regulaciones formales o informales vigentes en las fronteras norte y sur frente al comercio de la gramínea (Delgado Ormaza, s.f.)

Sin embargo, la variación en el rendimiento de la producción de arroz ha sido fuertemente incidido por factores ambientales y antrópicos, ocasionando bajas producciones y por ende afectando la fuente de sustento económico de las familias del sector rural.

Pesticidas

Los pesticidas son compuestos químicos que se utilizan para eliminar plagas. Son agentes químicos o biológicos que debilitan, incapacitan y matan a las plagas. Según los tipos de plagas objetivo, los plaguicidas se pueden dividir en varios grupos, a saber, insecticidas, herbicidas, raticidas, bactericidas, fungicidas y larvicidas (Raffa & Chiampo, 2021).

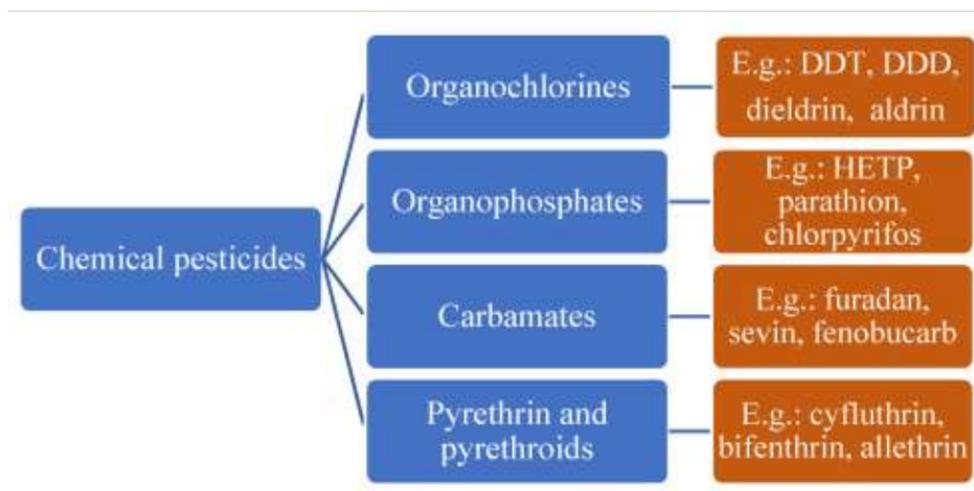
Este tipo de compuestos pueden clasificarse en base a tres criterios: por origen (natural o sintético), según el objetivo (herbicidas, fungicidas, insecticidas, entre otros) o por composición química.

Por composición química se subdividen a su vez en cuatro grupos químicos que son: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretrinas y piretroides (Figura 2). Este tipo de composición permite identificar sus características físicas y químicas para determinar su modo de aplicación y evitar complicaciones o daños severos por un mal manejo. Algunos ejemplos de plaguicidas más usados para el control de plagas en cultivos de arroz se muestran en la tabla 2, siendo alfa cipermetrina y dimetoato muy comunes en la provincia del Guayas y los Ríos:

Alfa cipermetrina. Es un tipo de piretroide sintético que actúa por ingestión y contacto para el control de piojos, garrapatas, ácaros y moscas, sensible al aire y a la luz (Raffa & Chiampo, 2021)

Dimetoato. Pesticida organofosforado sintético que incluye ésteres de ácido fosfórico con modo de acción de contacto e ingestión y acción a nivel sistémico muy eficaz en el control de insectos masticadores, minadores y chupadores en cultivos de futas y cereales como el arroz (PHYTOHEMEROTECA, 2005).

Figura 2: Clasificación de los pesticidas según la composición químicas.



Nota: Obtenido de (Raffa & Chiampo, 2021)

Tabla 2: Insecticidas usados en el cultivo de arroz.

Grupo químico	Modo de acción	Nombre químico
Organofosforados	De contacto con afección a nivel sistémico	Dimetoato Clorpirifos Profenofos Diazinon
Carbamatos	De contacto con afección a nivel sistémico	Carbofuran
Piretroides	De contacto	Alfa-cypermctrina Cipermetrina Lambdacyhalorina
Avermectinas	De ingestión	Teflubenzuron Diflubenzuron Clorfuazuron
CHO	De contacto e ingestión	Etofenprox

Fuente: (FEDEARROZ & AMTEC, 2018)

Capítulo II: Materiales y métodos

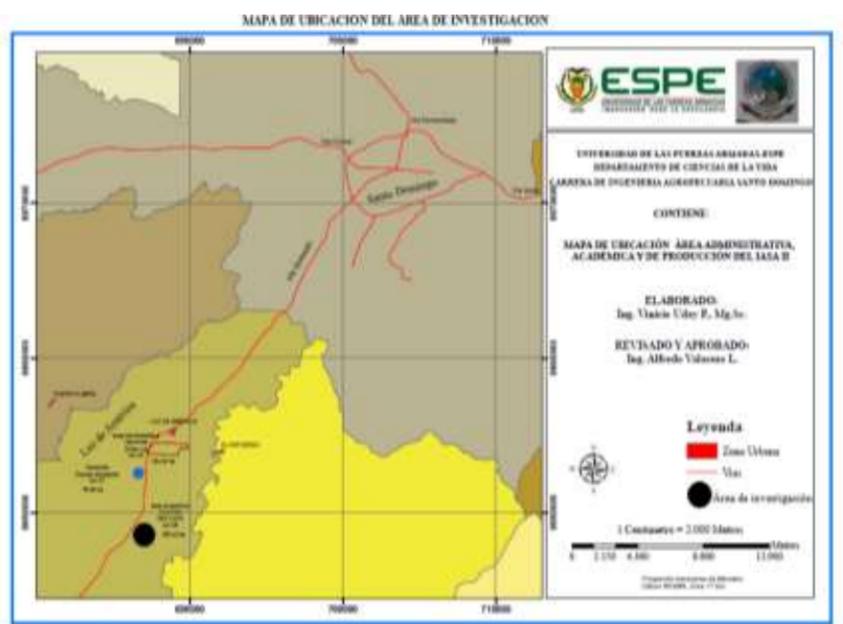
Área de estudio

El área donde se realizó la fase de laboratorio tuvo lugar en el laboratorio de microbiología de suelos de la Universidad de las Fuerzas Armadas- Sede Santo Domingo, parroquia “Luz de América”, ubicación política descrita en la Tabla 3 y la ubicación geográfica en la Figura 3.

Tabla 3: Ubicación política de la zona donde se llevó a cabo el estudio

País	Ecuador
Provincia	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón	Santo Domingo de los Colorados
Parroquia	Luz de América
Predio	Laboratorios de la Hcda. “Zoila Luz”
Dirección	Km 24 Vía Santo Domingo – Quevedo margen izquierdo

Figura 3: Ubicación geográfica del laboratorio



- Latitud: 00° 24' 36"
- Longitud: 79° 18' 43"
- Altitud: 270 msnm
- Zona de vida: Bosque húmedo Tropical
- Temperatura media: 24.6 °C
- Precipitación: 2860 mm año-1

- Humedad relativa: 85%
- Heliofanía: 680 horas luz año-1
- Suelos: Francos Arenoso

Materiales y reactivos

Los insumos, equipos y materiales usados durante el proyecto se describen a continuación en la tabla 4.

Tabla 4: *Instrumentos del laboratorio y reactivos empleados*

Materiales	Reactivos	Equipos
Cajas Petri	(NH ₄) ₂ SO ₄	Autoclave
Erlenmeyer de 125 mL	KH ₂ PO ₄	Cámara de flujo laminar
Botella para medios de cultivo	MgSO ₄ *7H ₂ O	Plato calentador
Vasos de precipitación 50, 100 y 250 mL	CaCl ₂ *2H ₂ O	Balanza analítica
Probeta de 100 mL	Alcohol potable	Incubadora
Mecheros de alcohol	Agar	Vórtex
Varilla de vidrio	Agua destilada estéril	Agitador orbital
Varilla bacteriológica	Medio LB	Centrífuga
Asa bacteriológica	Extracto de levadura	Espectrofotómetro Uv-Vis
Film plástico		
Tubos con tapa rosca		
Tubos de centrifuga		
Gradillas de plástico		
Pipetas de 10 mL		
Micropipeta de 1000 y puntas de 1ml		

Enriquecimiento y aislamiento de bacterias que degradan los pesticidas dimetoato y alfa cipermetrina

Muestreo

Las muestras de suelo fueron tomadas de suelos contaminados con alfa cipermetrina y dimetoato de la Hacienda “Proyecto riego Babahoyo” perteneciente al sector “Valle verde” cantón Babahoyo provincia de los Ríos. Los suelos contaminados se recolectaron de la superficie a una profundidad de 0 a 15 cm con espátulas estériles, fueron transportadas en fundas de plástico herméticas y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Enriquecimiento bacteriano

Las muestras se secaron en estufa a 32°C por 2 días, posteriormente se tamizó la muestra en un tamiz de 2mm. Posteriormente se realizaron agujeros en la parte inferior interna, se colocó papel filtro en el fondo y se le agregó 100 gr de la muestra de suelo tamizada, luego se añadió 100 ml de agua y se midió el volumen de agua que no absorbió el suelo, de este modo se determinó la retención de agua del suelo para el posterior enriquecimiento con alfa cipermetrina a 50 y 100 ppm; el proceso se repitió con el plaguicida dimetoato.

Procesamiento de las muestras

Se pesaron 10 gr de la muestra de suelo y se disolvieron en 100 ml de agua destilada estéril, se agitó en vórtex por 5 minutos y se obtuvo la primera dilución 10^{-1} , se continuó realizando diluciones seriadas en tubos de ensayo hasta obtener la dilución 10^{-5} , todo en condiciones estériles en cámara de flujo laminar.

Se tomó 150 μ l de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y se inocularon en placas de Petri con Medio Mínimo de Sales Minerales sólido (Tabla 5), previamente esterilizado a 121°C por 1 hora en intervalos de 30 minutos, las placas se incubaron a 25°C y se contabilizaron las unidades formadoras de colonia para determinar la biomasa de la muestra de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$UFC/mL = \frac{N^{\circ} \text{ colonias} \times \text{factor de dilución}}{mL \text{ de muestra sembrada}}$$

Tabla 5: Componentes del Medio Mineral de Sales Minerales MSM

Componente	Cantidad (gr/L)
Sulfato de amonio $(NH_4)_2 SO_4$	2
Fosfato monopotásico KH_2PO_4	2
Sulfato de magnesio heptahidrato $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
Cloruro de calcio dihidrato $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1
Pesticida*	

*La concentración de pesticida depende al tratamiento, sea este Alfa cipermetrina o Dimetoato. El pesticida se agrega después de la esterilización con el medio tibio.

Aislamiento bacteriano

Con un asa microbiológica se tomó una muestra de cada una de las cepas que presentaron tolerancia al plaguicida expuesto y se sembró por estriado en medio MSM sólido nuevo, el cual estaba enriquecido con alfa cipermetrina y dimetoato a concentraciones de 50 y 100 ppm. Para obtener cultivos puros se volvió a sembrar en estría hasta obtener cepas bien diferenciadas, sin indicativos de contaminación y manteniendo un control.

Selección de bacterias degradadoras de pesticidas

Para la selección de las colonias bacterianas con mejor capacidad de degradación de alfa cipermetrina y dimetoato, se escogieron aquellas cepas que presentaron un rápido crecimiento tras 24 horas de incubación en medio MSM sólido con 100 ppm de plaguicida; adicionalmente, se verificó que las cepas no presenten contaminación, que tengan un adecuado tamaño de colonia y buenas características macroscópicas. Finalmente, las colonias preseleccionadas fueron aisladas mediante el método de sembrado por estría en medio sólido MSM enriquecido con el plaguicida correspondiente y fueron incubadas a 25°C de forma invertida para evitar posible contaminación por la caída de agua condensada sobre la superficie de agar.

Identificación bacteriana

Identificación fenotípica

Para la respectiva caracterización de las cepas seleccionadas, se usaron cultivos bacterianos puros aislados, para la identificación microscópica se tomó una muestra de la cepa, se diluyó en una gota de agua destilada y se fijó con calor en un portaobjetos, posteriormente se le aplicó la reacción de tinción de Gram y se logró definir la morfología y pigmentación de la bacteria. El mismo proceso se repitió para cada cepa.

Además, se realizó una identificación macroscópica de las cepas de interés, se registró información de la morfología, color, bordes, tamaño y superficie presentada por cada colonia bacteriana. En adición, se realizó una prueba de catalasa para la cual se tomó una muestra de la cepa, se esparció en un portaobjetos y se agregó peróxido de hidrógeno al 3%. Todos los resultados fueron registrados.

Identificación molecular

Para la identificación genotípica de las cepas seleccionadas, los cultivos puros aislados fueron enviados a Macrogen (Corea) en cajas Petri de vidrio para su respectiva secuenciación. El grupo taxonómico más cercano fue identificado por el fragmento de gen del rRNA 16S BLAST usando bases de datos de secuencias de nucleótidos DDBJ/ EMBL/ GenBank.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó el fragmento usando cebadores universales que amplifican la región 16S del ARN ribosomal de las bacterias, el cebador de inicio fue el 785F “GGATTAGATACCCTGGTA” de 18 pb y cebador reverso 907R “CCGTCAATTCMTTTRAGTTT” de 20 pb.

Evaluación del potencial degradador de las bacterias seleccionadas

Para el análisis de la degradación se prepararon suspensiones bacterianas de cada cepa en medio líquido LB Luria-Bertani en agitación constante a 25°C, tras 24 horas de incubación se tomaron 6 ml de la suspensión y se centrifugó a 4 000 rpm por 20 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en solución de NaCl al 0.9%, se homogenizan las células y se vuelve a centrifugar a 4 000 rpm por 20 minutos, este proceso se repite 2 o 3 veces. En el último lavado se retira el sobrenadante y se añade 4 ml de medio MSM líquido estéril, en el espectrofotómetro a 600 nm se ajusta la absorbancia a 1 OD y se vertió el inóculo en Erlenmeyers (recubiertos de aluminio y tapón de algodón) con 50 mL de medio MSM líquido estéril enriquecido con plaguicida de acuerdo con los tratamientos de la Tabla 7. Posteriormente, se mantuvo en agitación constante a 25°C y se determinó la curva de crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría a 600 nm tomando mediciones cada hora desde las 18 a 24 horas de incubación. Con la medida de las 24 horas, en un diseño de parcelas sub subdivididas se identificó al tratamiento con mayor crecimiento bacteriano.

Para determinar la degradación se mantuvo el cultivo en agitación por 4 días, se tomó 6 mL del cultivo y se centrifugó a 4 000 rpm por una hora, se tomó el sobrenadante y se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 168 nm para alfacipermetrina y 290 nm para dimetoato.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se consideró un diseño de parcelas sub sub divididas, analizando las parcelas descritas en la Tabla 6.

Tabla 6: Factores y niveles del diseño de Parcelas sub sub divididas

	Factores	Niveles
Parcela Principal	Plaguicida	1: Alfacipermetrina 2: Dimetoato
Sub parcela	Cepa	1: C1 2: C2
Sub sub parcela	Concentración	1: 0 ppm 2: 300 ppm 3: 600 ppm

Tabla 7: Tratamientos a evaluar para determinar el crecimiento bacteriano y degradación

Tratamiento	Plaguicida	Cepa	Concentración
T1	Alfa cipermetrina	C1	0 ppm
T2	Alfa cipermetrina	C1	300 ppm
T3	Alfa cipermetrina	C1	600 ppm
T4	Alfa cipermetrina	C2	0 ppm
T5	Alfa cipermetrina	C2	300 ppm
T6	Alfa cipermetrina	C2	600 pm
T7	Dimetoato	C1	0 ppm
T8	Dimetoato	C1	300 ppm
T9	Dimetoato	C1	600 ppm
T10	Dimetoato	C2	0 ppm
T11	Dimetoato	C2	300 ppm
T12	Dimetoato	C2	600 pm

Cada tratamiento descrito en la tabla 7; tuvo 3 repeticiones con un total de 36 observaciones experimentales. Los resultados se analizaron en el programa estadístico Tinn-R, con el análisis de varianza descrito en la Tabla 8, además se realizó una prueba de diferencia de medias Tukey con un valor de significancia de 0,05 para determinar el tratamiento con mayor crecimiento y degradación.

Tabla 8: *Análisis de varianza para la determinación de crecimiento bacteriano y degradación*

Fuente de variación	Grados de libertad
Repetición	2
Plaguicida	1
Error plaguicida	2
Cepa	1
Plaguicida*Cepa	1
Error cepa	4
Concentración	2
Concentración*plaguicida	2
Concentración*cepa	2
Concentración*plaguicida*cepa	2
Error total	16

Además, se presentaron las siguientes hipótesis:

Ho: El factor plaguicida tiene influencia sobre las variables crecimiento y degradación

Ha: El factor plaguicida no tiene influencia sobre las variables crecimiento y degradación

Ho: El factor cepas tiene influencia sobre las variables crecimiento y degradación

Ha: El factor cepas no tiene influencia sobre las variables crecimiento y degradación

Ho: El factor concentración tiene influencia sobre las variables crecimiento y degradación

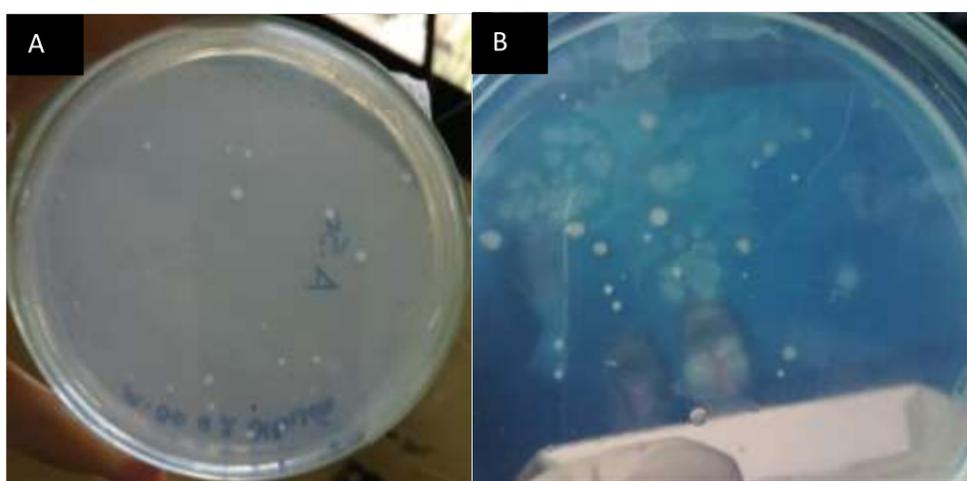
Ha: El factor concentración no tiene influencia sobre crecimiento y degradación.

Capítulo III: Resultados

Aislamiento y purificación de microorganismos

Se obtuvieron 6 cepas bacterianas tolerantes a los plaguicidas, de las cuales 3 crecieron en medio MSM con alfacipermetrina y otras 3 cepas en medio MSM con dimetoato (Figura 4), tras varias siembras en estriado se obtuvieron bacterias completamente puras y sin rastro de contaminación.

Figura 4: *Cepas bacterianas tolerantes al plaguicida alfacipermetrina y dimetoato*



Nota: Crecimiento de las primeras colonias bacterianas tolerantes a los plaguicidas de estudio en medio MSM suplementado con 100 ppm de plaguicida, tras 24 h de siembra. **A** Crecimiento MSM con alfa cipermetrina. **B**, Crecimiento en medio MSM con Dimetoato. En ambos casos se usó el inóculo del factor de dilución 1×10^{-4} .

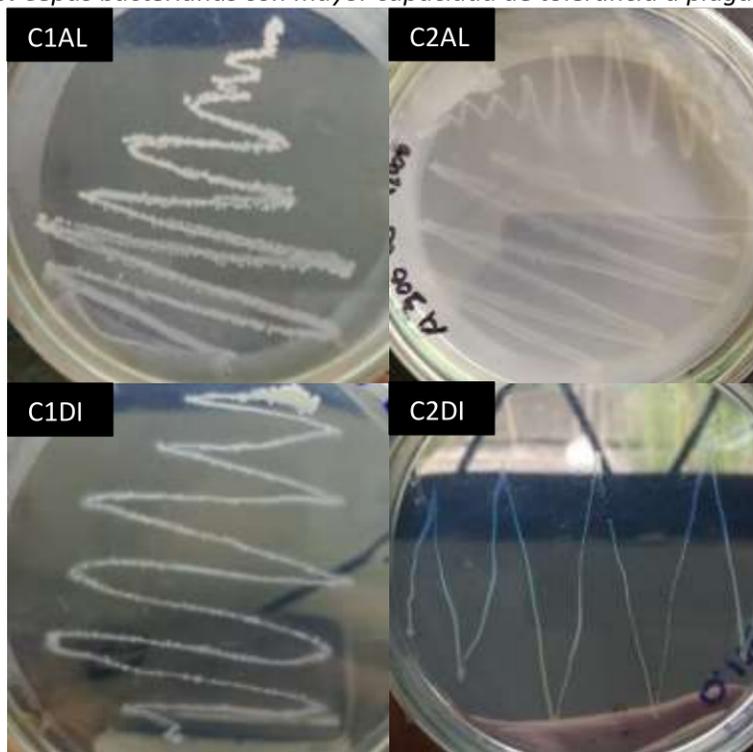
Selección de bacterias con mayor potencial degradador

De las 6 cepas aisladas se seleccionaron 4 cepas nombradas como C1AL, C2AL, C1DI y C2DI de acuerdo al plaguicida del cual derivan (Figura 5), mostraron un mejor crecimiento de biomasa en medios MSM contaminados con Alfa cipermetrina y Dimetoato a concentraciones de 50 y 100 ppm respecto a las demás cepas halladas.

La selección de estas bacterias fue realizada en base a su nivel de tolerancia, cualidades organolépticas y capacidad de crecimiento en 24 horas bajo presencia de pesticidas, por lo que las demás cepas se eliminaron para ensayos futuros debido a su bajo y lento crecimiento en

medios contaminados. Todas las 4 cepas presentaron un nivel de tolerancia deseado el cual se obtuvo a partir de recuentos bacterianos (UFC) de siembras con dilución 1×10^{-4} de las cepas con el fin de seleccionar aquellas con mayor crecimiento poblacional.

Figura 5: *Cepas bacterianas con mayor capacidad de tolerancia a plaguicidas*



Nota: Cepas C1AL, C2AI, C1DI y C2DI en medio MSM suplementado con 100 ppm de pesticidas.

Pruebas de identificación bacterianas

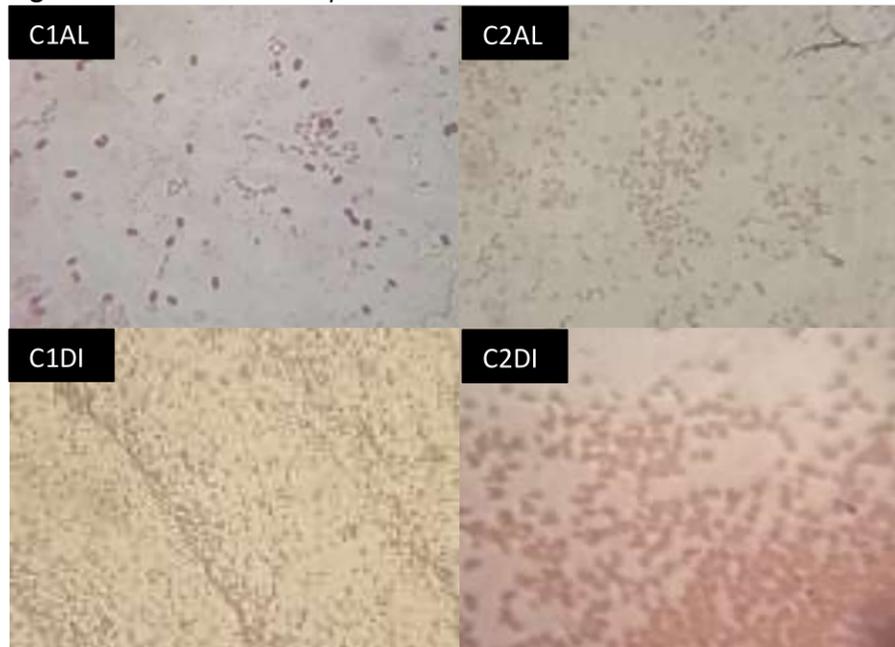
Identificación fenotípica

Las cepas seleccionadas por la tolerancia y crecimiento en medios contaminados fueron caracterizadas en base algunas características fenotípicas y bioquímicas. En cuanto a la morfología colonial estas presentaron grandes diferencias. Las cepas C1AI y C2DI crecieron en colonias con forma irregular, mientras que las cepas C2AI y C1DI de forma puntiforme. Otras características como el borde, tamaño, elevación y color tampoco fueron similares entre las cepas estudiadas, estos resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9: Características macroscópicas de las cepas tolerantes a plaguicidas

Cepa	Forma	Borde	Color	Textura	Elevación
C1AL	Irregular	Ondulado	Blanco	Viscosa	Convexa
C2AL	Puntiforme	Entero	Celeste	Seca	Plana
C1DI	Puntiforme	Entero	Celeste	Viscosa	Convexa
C2DI	Irregular	Lobulado	Blanco	Cremosa	Elevada

Según los análisis de Tinción de Gram realizados a todas las bacterias resultaron ser Gram negativas (Figura 6). Las 4 cepas seleccionadas por la tolerancia a plaguicida presentaron un color rojizo indicando que son Gram negativas y forma de varilla similar a los bacilos. También se realizó una caracterización bioquímica y enzimática de las cepas seleccionadas, los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 10 y figura 7.

Figura 6: Bacterias teñidas por Tinción de Gram

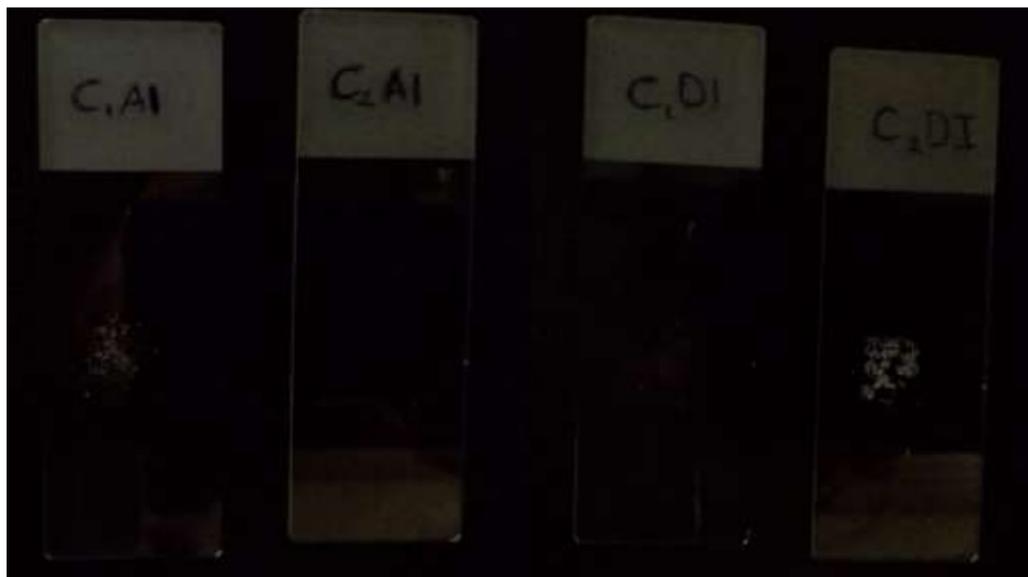
Nota: Imagen obtenida desde microscopía óptica, 100 X.

Tabla 10: Caracterización bioquímica

Cepa	Catalasa
C1AL	+
C2AL	-
C1DI	-
C2DI	+

Nota: Prueba bioquímica realizada para las 4 cepas seleccionadas. Reacción positiva (+) y reacción negativa (-).

Figura 7: Prueba bioquímica de Catalasa



Nota: Imagen representa la prueba de catalasa para las cepas seleccionadas, en donde C1AL y C2DI son positivas a la reacción por la presencia de burbujas y las cepas C2AI y C1DI fueron negativas.

Identificación molecular

La identificación molecular de las cepas bacterianas con mayor tolerancia se realizó con base en las secuencias del fragmento 16S rRNA de las muestras obtenidas mediante secuenciación de Sanger (macrogen). La tabla 8 muestra la comparación de las secuencias de 16S rRNA de las cepas 4 cepas seleccionadas, las cepas C1AL y C2DI mostraron una similitud >99% con las especies degradadoras de compuestos aromáticos *Delftia sp.* y *Novosphingobium aromaticivorans*. Las cepas C2AL, C1DI tuvieron valores de identidad menores, los cuales fueron del 96% y 86% de similitud con las bacterias *Sphingobium sp.* y *Delftia lacustris*.

Tabla 8: Asignación filogenética de cepas aisladas tolerantes a alfa cipermetrina y dimetoato según la similitud encontrada en las secuencias del gen 16S rRNA.

Cepas	Cepa más relacionada	Identidad (%)	Accesión a NCBI
C1AI	<i>Delftia sp.</i>	99	FJ191736.1
C2AI	<i>Sphingobium sp.</i>	96	KF777679.1
C1DI	<i>Delftia lacustris</i> strain RPK49	86	KX980471.1
C2DI	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	99	KF381499.1

Nota: La tabla muestra los resultados de la identificación a nivel molecular basado en la secuenciación completa del gen 16S rRNA y comparación mediante la herramienta BLAST de las mismas con las indexadas en la base de datos GenBank del NCBI.

Evaluación de la degradación de los pesticidas alfa-cipermetrina y dimetoato

Se analizó la capacidad degradadora de cada una de las cepas seleccionadas en función a las variables crecimiento y porcentaje de degradación.

Tabla 11: *Análisis de varianza para la variable crecimiento*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Repetición	2	0,0835	0,0418	0,8442	0,542227
Plaguicida	1	11,6372	11,6372	235,2080	0,004225**
Error plaguicida	2	0,0990	0,0495		
Cepa	1	0,0497	0,0497	3,0265	0,156894
Plaguicida*Cepa	1	0,0496	0,0496	3,0175	0,157372
Error cepa	4	0,0657	0,0164		
Concentración	2	6,4379	3,2189	109,6919	4,558e-10***
Concentración*plaguicida	2	6,1517	3,0759	104,8164	6,394e-10***
Concentración*cepa	2	0,0535	0,0268	0,9123	0,421494
Concentración*plaguicida*cepa	2	0,0561	0,0281	0,9559	0,405360
Error total	16	0,4695	0,0293		

El análisis de varianza de la Tabla 11 correspondiente a la variable crecimiento, permitió identificar que existe diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) en los factores Plaguicida y Concentración, así como en la interacción Concentración*Plaguicida. El factor repetición no presenta diferencia significativa, por tanto, existe normalidad en la toma de datos.

Tabla 12: *Análisis de varianza para la variable degradación*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Repetición	2	0,009	0,0044	0.4692	0.6806287
Plaguicida	1	20,195	20,1945	2141.5899	0.0004666***
Error plaguicida	2	0,019	0,0094		
Cepa	1	0,002	0,0018	0.3766	0.5726277
Plaguicida*Cepa	1	0,001	0,0005	0.1070	0.7599801
Error cepa	4	0.019	0,0049		
Concentración	2	35,760	17,8798	2402.7576	2.2e-16***
Concentración*plaguicida	2	10,254	5,1268	688.9601	2.22e-16***
Concentración*cepa	2	0,004	0,0021	0.2765	0.7620183
Concentración*plaguicida*cepa	2	0,046	0,0228	3.0631	0.0747645
Error total	16	0,119	0,0074		

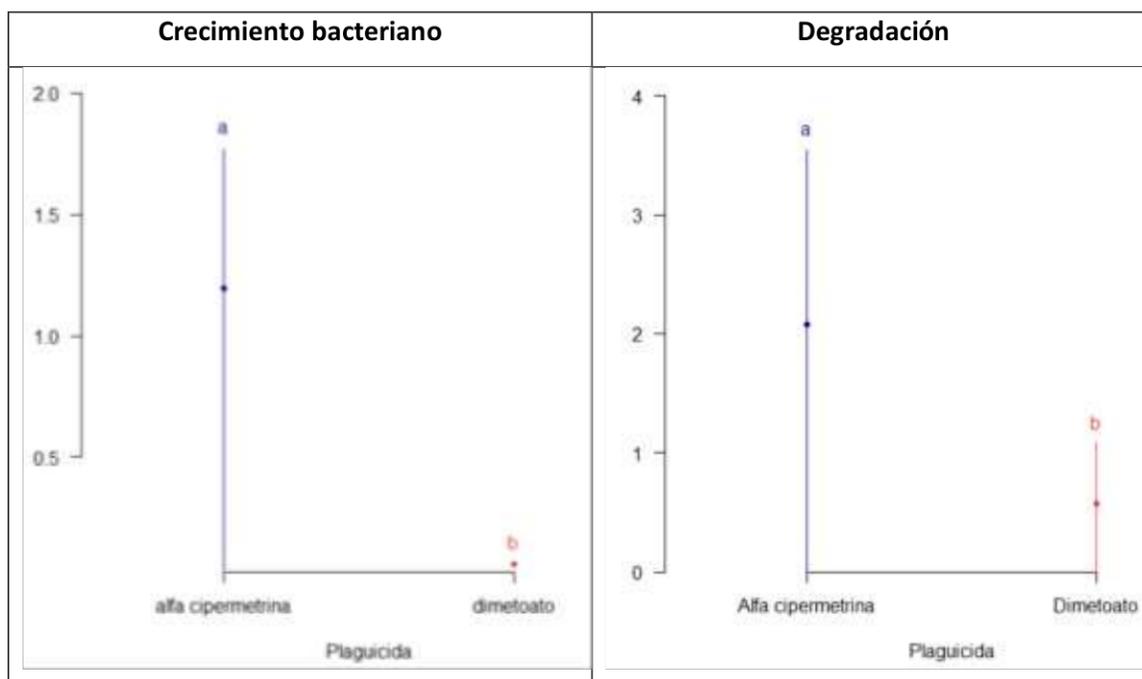
El análisis de varianza de la Tabla 12 correspondiente a la variable degradación, permitió identificar que existe diferencia significativa en los factores Plaguicida y Concentración, así como en la interacción Concentración*Plaguicida. El factor repetición no presenta diferencia significativa, por tanto, existe normalidad en la toma de datos.

Prueba de significancia de Tukey para el factor plaguicida

Tabla 13: Comparación de medias Tukey $>0,05$ para el factor plaguicida

Plaguicida	Crecimiento bacteriano	Degradación
Alfa cipermetrina	$1,19 \pm 0,05$ (A)	2,07 (A)
Dimetoato	$0,056 \pm 0,05$ (B)	0,57 (B)

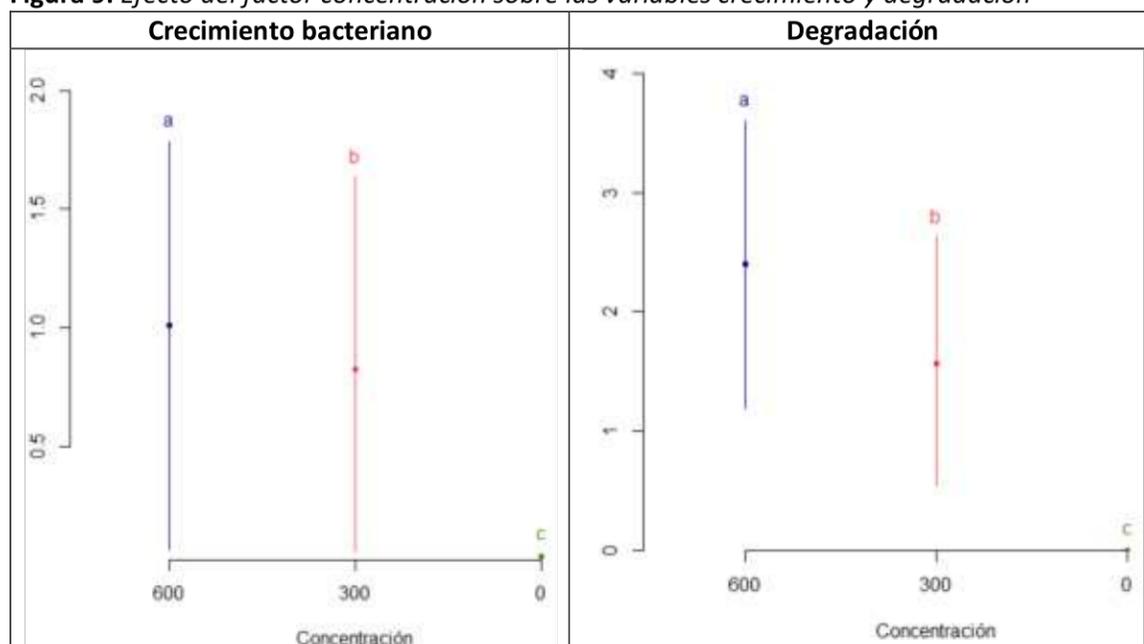
Figura 8: Efecto del factor plaguicida sobre las variables crecimiento y degradación



La tabla 13 y figura 8 corresponden a la prueba de comparación de medias de Tukey para el factor plaguicida, en los resultados se identificaron 2 grupos independientes. En la variable crecimiento bacteriano, con el plaguicida alfa cipermetrina se tuvo mayor crecimiento con una media de 1,19 OD y con el plaguicida dimetoato se tuvo un menor crecimiento con una media de 0,056 OD. En cuanto a la variable degradación, con el plaguicida alfa cipermetrina se tuvo mayor porcentaje de degradación con una media de 2,07% y con el plaguicida dimetoato se tuvo un menor porcentaje de degradación con una media de 0,57%.

Tabla 14: Comparación de medias Tukey >0,05 para el factor concentración

Concentración	Crecimiento bacteriano	Degradación
600 ppm	1,012 ± 0,3 (A)	2,40 (A)
300 ppm	0,825 ± 0,3 (B)	1,56 (B)
0 ppm	0,036 ± 0,3 (C)	0 (C)

Figura 9: Efecto del factor concentración sobre las variables crecimiento y degradación

La tabla 14 y figura 9 indican la prueba de comparación de medias de Tukey para el factor concentración, en los resultados se identificaron 3 grupos independientes, los tratamientos con una concentración de 600 ppm tuvieron mayor crecimiento bacteriano con una media de 1,012 OD y 2,40% de degradación, los tratamientos con una concentración de 300 ppm tuvieron una media de 0,825 OD y 1,56% de degradación; y los tratamientos con una concentración de 0 ppm tuvieron una media de 0,036 OD con un 0% de degradación.

Tabla 15 Comparación de medias Tukey >0,05 para la interacción plaguicida*concentración

Plaguicida	Concentración	Crecimiento bacteriano	Degradación
Alfacipermetrina	600 ppm	1,957 (A)	3,608 (A)
Alfacipermetrina	300 ppm	1,597 (B)	2,61 (B)
Dimetoato	600 ppm	0,34 (C)	1,2 (C)
Dimetoato	300 ppm	0,133 (C)	0,527 (D)
Dimetoato	0 ppm	0,0418 (C)	0 (E)
Alfacipermetrina	0 ppm	0,0295 (C)	0 (E)

En la tabla 15 se muestra la prueba de comparación de medias de Tukey para la interacción plaguicida*concentración, los tratamientos con Alfa cipermetrina a 600 ppm tuvieron mayor crecimiento bacteriano con una media de 1,957 OD y 3,608% de degradación, mientras que los tratamientos que no tuvieron adición de plaguicida (0 ppm) tuvieron el menor crecimiento con una media de 0,0295 OD con un 0% de degradación.

Figura 10: Efecto de la interacción Plaguicida*Concentración en la variable crecimiento

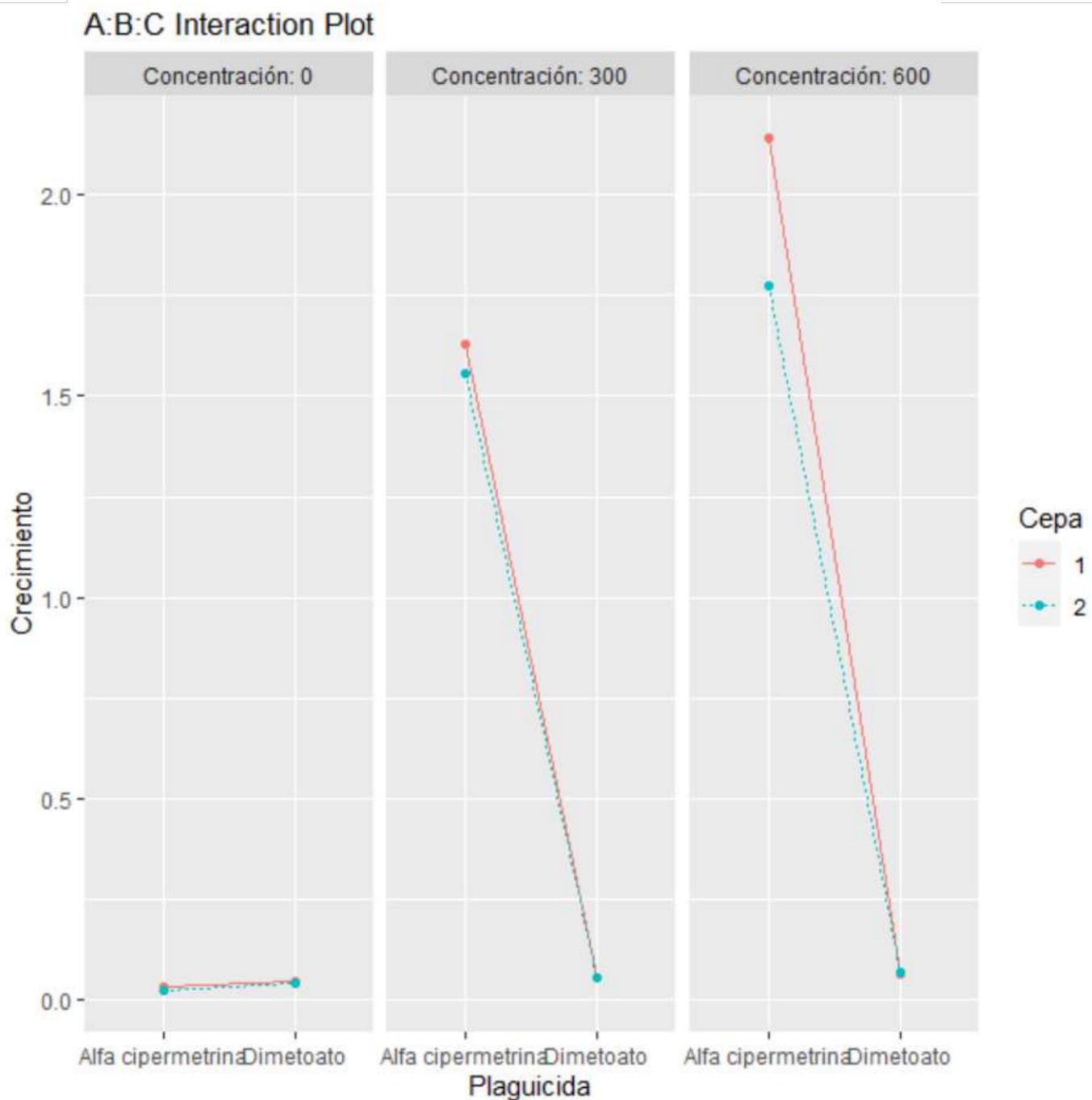
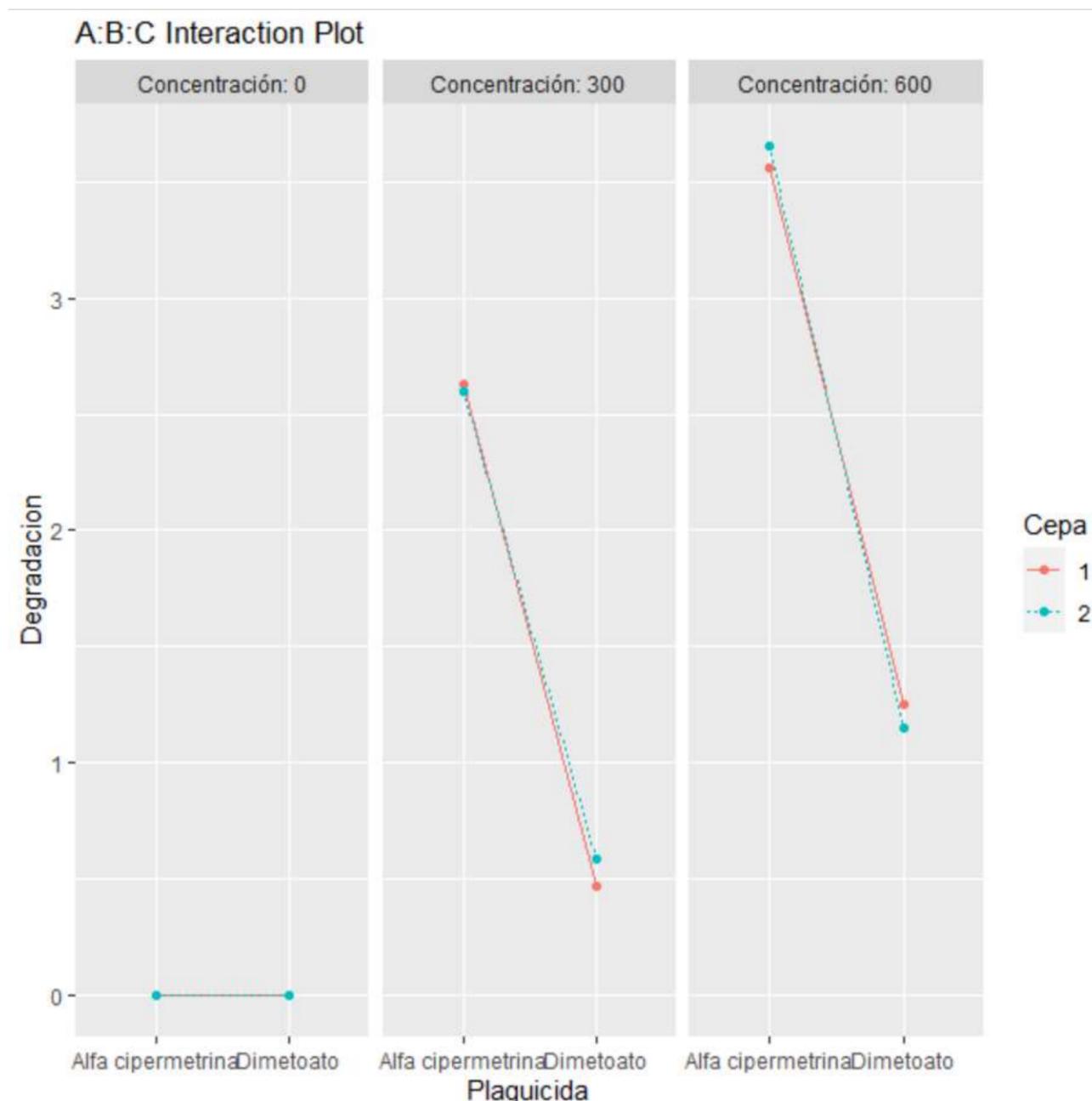
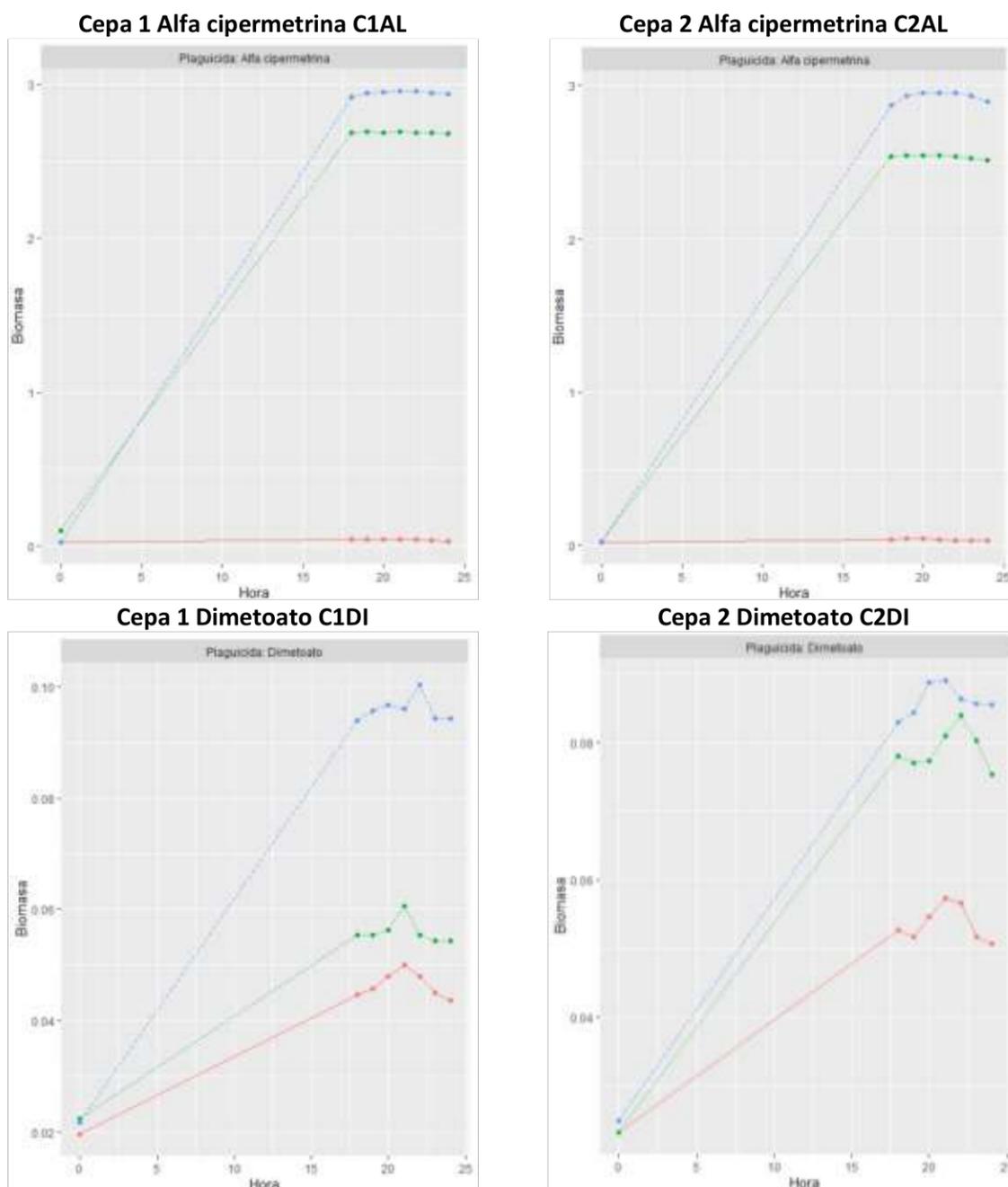


Figura 11: Efecto de la interacción Plaguicida*Concentración en la variable degradación



Las figuras 10 y 11 representan la interacción entre el factor concentración y el factor plaguicida sobre el crecimiento bacteriano y el porcentaje de degradación, respectivamente; estas evidencian que existe mayor crecimiento bacteriano y porcentaje de degradación en los tratamientos con plaguicida alfa cipermetrina a una concentración de 600 ppm.

Figura 12: Curva de crecimiento bacteriano



Nota: Las líneas rojas corresponden a la concentración 0 ppm, las líneas verdes a la concentración 300 ppm y las líneas azules a la concentración 600 ppm.

La figura 12 demuestra el crecimiento por 24 horas de las 4 cepas aisladas, se evidencia que todas tienen un pico máximo de crecimiento entre las 21 y 22 horas, por tanto se considera que tanto el crecimiento como la degradación es similar en todas las cepas.

Capítulo IV: Discusión

Enriquecimiento y aislamiento de bacterias que degradan los pesticidas alfa-cipermetrina y dimetoato

Se ha informado de poblaciones bacterianas de los géneros como *Streptomyces*, *Arthrobacter* y *Achromobacter* (Briceño et al, 2020) responsables de la degradación de plaguicidas, cepas bacterianas que han sido aisladas de suelos contaminados.

Colorado y col. (2016) reportaron bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* con capacidad degradadora de compuestos organofosforados, las cuales fueron aisladas igualmente de terrenos contaminados. Además, otros estudios han descrito el potencial de usar consorcios bacterianos autóctonos aislados de suelos contaminados para degradar distintas mezclas de plaguicidas a diferentes concentraciones (Briceño et al, 2020).

Considerando la literatura científica expuesta, en este estudio también se pudo obtener 4 cepas aisladas de suelos contaminados con los plaguicidas alfa cipermetrina y dimetoato, estas cepas demostraron tolerar una concentración de hasta 600 ppm de insecticida. El aislamiento de cepas con tolerancia a un compuesto químico se realiza netamente de suelos contaminados con dichas sustancias, ya que los terrenos con exposición prolongada de estos contaminantes han obligado, de alguna manera, a la población microbiana a desarrollar mecanismos que le permitan tolerar y sobrevivir en un medio contaminado. Entre las adaptaciones acogidas por la microflora del suelo, se destaca la constitución de rutas metabólicas que usen los compuestos químicos como fuente de carbono para su crecimiento y multiplicación.

Selección de bacterias degradadoras de pesticidas

Para la selección de bacterias degradadoras se usó el medio MSM suplementado con dos concentraciones de cada plaguicida (50 y 100 ppm) como única fuente de carbono, además, las cepas se incubaron a 25 °C, ya que (Hernández-Ruiz, 2017) describió que la temperatura entre 25 a 37°C es óptima para la degradación microbiana de compuestos organofosforados (Dimetoato) y piretroides (Alfa cipermetrina).

Para seleccionar bacterias con capacidad degradadora, el pH del medio fue ajustado entre 6.7 y 6.8, esto con el fin de garantizar la integridad biológica de los microorganismos aislados y posteriormente controlar su crecimiento (Bracho Mariangela, 2004). Algunos estudios realizados con bacterias degradadoras de hidrocarburos y pesticidas, señalan que en un pH cercano a 7 el proceso de mineralización y degradación de compuestos químicos es más eficiente.

Las cepas bacterianas C1AL, C2AL, C1DI y C2DI fueron seleccionadas por demostrar un mejor perfil degradador, se consideraron factores como la tasa de crecimiento, tolerancia y cualidades organolépticas. Colorado y col. (2016) también seleccionaron las 3 mejores cepas degradadoras de pesticidas OF en función del tamaño de colonia, crecimiento y cualidades morfológicas, además sugirieron utilizar recuentos microbianos como metodología complementaria para obtener información sobre el nivel de tolerancia y su potencial de degradación. Sin embargo, Margesin y col. (2003) mencionan que el conteo en placa es un método que subestima la verdadera densidad de una población, ya que sólo una pequeña fracción de microorganismos puede cultivarse y aislarse en los laboratorios, mientras que para el resto de la población bacteriana aún se desconocen los requisitos de crecimiento adecuados.

Identificación bacteriana

Los resultados obtenidos en la identificación fenotípica de las bacterias aisladas concuerdan con lo reportado en otros trabajos, en donde identificaron bacilos Gram negativos con potencial degradador de organofosforados y OF (Briceño et al, 2020) (Colorado Beatriz, 2016) (Bracho Mariangela, 2004). También se ha informado que cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* y *Micrococcus* (cocos Gram positivos), con capacidad degradadora de hidrocarburos y pesticidas, tienen un mayor crecimiento en ambientes contaminados que los bacilos; no obstante, el trabajo realizado por Soto (2001) demostró que los bacilos tienen la capacidad de metabolizar los contaminantes con mayor eficiencia y rapidez que los cocos Gram positivos (Soto, 2001).

De forma adicional, se realizó la secuenciación del fragmento 16S rRNA de las 4 cepas halladas con el fin de determinar su respectivo género y especie debido a que las pruebas bioquímicas fueron insuficientes para establecer si estas coincidían con las reportadas por otros trabajos. Dado a que el fragmento del gen 16S bacteriano es una secuencia exclusiva para cada

especie, ha surgido como un método preferido para determinar relaciones taxonómicas más allá del género, por lo tanto, se decidió utilizar el análisis del ARN ribosómico 16S por que constituye una diana universal para la identificación de bacterias (María, 2004).

El análisis de la secuencia del gen 16S de cada una de las cepas, mostraron la presencia de tres especies diferentes: *Novosphingobium aromaticivorans*, *Delftia lacustris* y *Sphingobium sp.*, las cuales se conocen como microorganismos metabólicamente activos capaces de degradar una variedad de compuestos aromáticos que forman parte de la estructura química de los piretroides (Alfa cipermetrina) y organofosforados (Dimetoato) (Kumar Chaudhary Dhiraj, 2021).

A pesar que los resultados no coinciden con la mayoría de estudios que informan el hallazgo de cepas como *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp* y *Enterobacter sp.* mayoritariamente reportadas como bacterias degradadoras de plaguicidas piretroides organofosforados y organoclorados (Colorado Beatriz, 2016) (Margesin, 2003), mediante este estudio se ha podido dar a conocer que estas cepas asociadas a la filosfera de plantas de arroz son capaces de degradar residuos de plaguicidas en el suelo.

Degradación de los pesticidas alfa-cipermetrina y dimetoato

Las bacterias *Delftia sp.* y *Sphingobium sp* degradaron el 3,608% de alfa cipermetrina (600 ppm) en 4 días, en comparación con un estudio realizado por (Jiang et al, 2019) donde midieron la degradación microbiana de alfa cipermetrina en suelos agrícolas, se evidenció una degradación de 34,1% de alfa cipermetrina (10 ppm) en 80 días, esto demuestra que las cepas aisladas en la presente investigación toleran una mayor concentración de alfa cipermetrina.

Respecto a los resultados de la degradación de dimetoato no fueron los mismos reportados por otros estudios. Ahmad y col. (2021) aislaron *Brucella sp* de suelo agrícola de Pakistán que tolera hasta 100 ppm de dimetoato en medio MSM, esta cepa degradó el 83% de dimetato (100 ppm) en un periodo de 7 días presentando gran poder biorremediador, sin embargo las bacterias *Novosphingobium aromaticivorans* y *Delftia lacustris*, presentadas en este estudio, toleran hasta 600 ppm de dimetoato con un porcentaje de degradación de 1,2% en 4 días, lo cual demuestra un gran potencial degradador principalmente en zonas con exposición prolongada al plaguicida como es la provincia de Los Ríos.

Capítulo V: Conclusiones

Este estudio evidenció que, al aislar bacterias expuestas a contaminantes como los plaguicidas, se pueden encontrar cepas con un gran potencial degradador de los contaminantes, siendo una gran herramienta en biorremediación.

Se logró informar de 4 cepas bacterianas responsables de la degradación de los plaguicidas alfa cipermetrina y dimetoato, que fueron aisladas a partir de muestras de suelo agrícola con cultivo de arroz que ha estado expuesto por varios años a estos plaguicidas. Las cepas identificadas como *Delftia sp.* y *Sphingobium sp* degradan alfa cipermetrina, mientras que *Novosphingobium aromaticivorans* y *Delftia lacustris* degradan dimetoato.

Todas las cepas halladas pertenecen al grupo morfológico de bacilos Gram negativos, los cuales son responsables de la transformación los residuos de plaguicidas, disponibles en el suelo, en compuestos menos tóxicos.

Las bacterias *Delftia sp.* y *Sphingobium sp* presentaron un mayor potencial degradador, ya que lograron degradar el 3,608% del plaguicida alfa cipermetrina (600 ppm) y las bacterias *Novosphingobium aromaticivorans* y *Delftia lacustris* alcanzaron un porcentaje de degradación del 1,2% de dimetoato (600 ppm).

Con base a los resultados de los factores plaguicida y concentración, se rechazan las hipótesis nulas y se aceptan las hipótesis alternativas, ya que el plaguicida y la concentración influyen en el crecimiento bacteriano y porcentaje de degradación. En cuanto a las cepas, se acepta la hipótesis nula, ya que todas presentan un crecimiento homogéneo y un mismo porcentaje de degradación.

Capítulo VI: Recomendaciones

Continuar investigando para establecer consorcios con las cepas autóctonas halladas, con el fin producir una mineralización más completa de los plaguicidas.

Evaluar la capacidad degradadora de las cepas por más tiempo (40-60 días), ya que así se podrá tener una mejor noción del potencial degradador de cada una, además se puede evaluar la influencia de variables como la temperatura, pH del medio, disponibilidad de nutrientes y aireación en el crecimiento bacteriano.

Investigar la actividad biorremediadora de las cepas aisladas, directamente sobre los suelos agrícolas que hayan sido expuestos a plaguicidas por varios años; y optimizar variables como la cantidad de cepa y tiempo de exposición para una máxima degradación de plaguicida en el suelo.

Capítulo VII: Bibliografía

- Ahmad, S., Chaudhary, H. J., & Damalas, C. A. (2021). Microbial detoxification of dimethoate through mediated hydrolysis by *Brucella* sp. PS4: molecular profiling and plant growth-promoting traits. *Environmental science and pollution research international*. doi:10.1007/s11356-021-15806-1.
- Bracho Mariangela, D. L. (2004). Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. *Scielo*, 526-535.
- Briceño et al, G. (2020). Pesticide-tolerant bacteria isolated from a biopurification system to remove commonly used pesticides to protect water resources. *PloS one*.
- Colorado Beatriz, B. A. (2016). Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados presentes en suelos contaminados. *Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 25(3), 13-22.
- Del Puerto, R., Asela, M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 372-387. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010&lng=es&tlng=es
- Delgado Ormazza, F. (s.f.). ARROZ DEL ECADOR PANORAMA NACIONAL.
- Delso, S. e. (2015). Insecticidas sistémicos (neonicotinoides y fipronil): tendencias, usos, modo de acción y metabolitos. *Environ Sci Pollut Res*, 22, 5-34.
- Devine, G. J., Eza, D., Ogusku, E., & Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 74-100. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342008000100011&lng=es&tlng=es
- Esaú López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2013). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*. Obtenido de www.medigraphic.org.mx
- FAO. (2018). *Guía de buenas prácticas para la gestión y uso sostenible de los suelos en áreas rurales*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/i8864es/l8864ES.pdf>
- FEDEARROZ, & AMTEC. (2018). *Manejo integrado de insectos en el cultivo de arroz*. Obtenido de http://www.fedearroz.com.co/docs/cartilla_manejo_insectos.pdf
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J., & Valdezate Ramos, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.

- García, Y., Ramírez, W., & Sánchez, S. (2012). Indicadores de la calidad de los suelos: una nueva manera de evaluar este recurso. *Pastos y Forrajes*, 35(2), 125-138. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000200001&lng=es&tlng=es.
- Hernández-Ruiz, G. M. (2017). Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. *Ciencia y Tecnología*, 18(1), 138-159.
- Jiang et al, B. (2019). Microbial degradation of organophosphorus pesticides: novel degraders, kinetics, functional genes, and genotoxicity assessment. *Environmental science and pollution research international*, 26(21), 21668–21681. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05135-9>
- Kalil, S. (2007). *Seguimiento del proceso de humificación en compost inoculado*. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8314/tesis288.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Karanasios, E., Karpouzas, D. G., & Tsiropoulos, N. G. (2012). Key parameters and practices controlling pesticides degradation efficiency of biobed substrates. *Journal of environmental science and health. Part B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 47(6), 589-598.
- Kaur, S., Kumar, V., Chawla, M., Cavallo, L., Poater, A., & Upadhyay, N. (2017). Pesticides Curbing Soil Fertility: Effect of Complexation of Free Metal Ions. *Frontiers in chemistry*. Obtenido de <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00043>
- Kumar Chaudhary Dhiraj, H. D.-U. (2021). *Novosphingobium olei* sp. nov., with the ability to degrade diesel oil, isolated from oil-contaminated soil and proposal to reclassify *Novosphingobium stygium* as a later heterotypic synonym of *Novosphingobium aromaticivorans*. *Microbiology society*, 71(2), 50-62.
- Leyva, M., Zamudio, M., Gonzáles, J., & Rojas, A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 99-115.
- MAG. (2020). *Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca*. Obtenido de Cifras agroproductivas: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- MAGAP. (2020). *Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca*. Obtenido de Ficha del cultivo de arroz:

http://sipa.agricultura.gob.ec:8099/views/FICHA_ARROZ/FICHA_ARROZ?:embed=yes&refresh=&customViews=no&:display_count=no&:showVizHome=no&:origin=viz_share_link

- Margesin. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Applied and environmental microbiology*, 6(69), 3085-3092.
- María, R. M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Elsevier*, 22(4), 238-245.
- Mendoza Avilés, H. E., Loo Bruno, Á. C., & Vilema Escudero, S. F. (2019). El arroz y su importancia en los emprendimientos rurales de la agroindustria como mecanismo de desarrollo local de samborondón. *Revista Universidad y Sociedad*, 324-330.
- PHYTOHEMEROTECA. (2005). *Danadim Progress, nueva formulación de dimetoato*. Obtenido de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/170-junio-julio-2005/danadim-progress-nueva-formulacin-de-dimeotat>
- Raffa, C. M., & Chiampo, F. (2021). Bioremediation of Agricultural Soils Polluted with Pesticides: A Review. *Bioengineering*, 92.
- Soto. (2001). Influencia de las relaciones bacterianas interespecíficas en el proceso de biodesulfuración de hidrocarburo aromáticos. *Universidad Central de Venezuela*, 132-140.
- UNLP, U. N. (2017). *El suelo: un universo invisible*. Obtenido de <https://unlp.edu.ar/frontend/media/98/27598/3f23fc987dbbda82587753c9796000a.pdf>
- Uquillas, E. (2015). ESTABLECIMIENTO DE UN POTENCIAL PROTOCOLO DE ACTUACIÓN PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN LAS AGUAS RESIDUALES DE LOS CENTROS DE ACOPIO DEL ECUADOR.
- Valarezo, O., & Muñoz, J. (2011). *Insecticidas de uso agrícola en el Ecuador*. Boletín informativo N°402, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIAP Portoviejo. Obtenido de Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIAP Portoviejo: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1253/1/INIAP%20bolet%C3%ADn%20divulgativo%20401.pdf>

Yaguana, G., Sánchez, F., Aguilar, M., & Pozo, E. (2019). *Contaminación de suelos: el caso de los plaguicidas*. Obtenido de <http://www.utn.edu.ec/ficayaemprende/?tag=suelos&print=print-search>