



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

Proyecto de investigación previo a la  
obtención del título de Magister en Gestión  
Ambiental.

**TEMA:**

“Caracterización molecular de bacterias tolerantes al cadmio y su capacidad biorremediadora  
de suelo cacaoero de la provincia de El Oro, Ecuador”.

**AUTOR:**

Ing. Luis Fernando Vera Benites

**DIRECTOR:**

Ing. Hayron Fabricio Canchignia Martínez Ph.D

**CO-DIRECTOR:**

Ing. Manuel Danilo Carrillo Zenteno Ph.D

**Quevedo - Los Ríos – Ecuador**

**2022**

## RESUMEN

El cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) es uno de los metales tóxicos más localizados en el ambiente, liberado por las industrias, maquinarias, agroquímicos y la actividad humana ocasionando que cultivos como *T. cacao* absorban y lo transporten a las almendras derivando problemas a la salud de los consumidores. El uso de bacterias tolerantes de cadmio (BtCd) reduce la absorción de Cd en cacao, debido a sus diferentes mecanismos de inmovilización como: la biomineralización, biolixiviación y biosorción. La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo “UTEQ” y en la cámara de crecimiento y laboratorio del Departamento de Manejo de suelos y aguas (DMSA) de la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP). Los objetivos del estudio fueron caracterizar molecularmente las BtCd y evaluar su capacidad biorremediadora en suelo cacaotero de la provincia de “El Oro”. Las cepas procedentes de la provincia de Manabí, se secuenciaron la región del ARNr 16S y se compararon con la plataforma de NCBI. Para conocer las variaciones de la absorción de Cd por la aplicación de BtCd, se empleó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), donde se aplicó el método de Neubauer en 100 g de suelo y se determinaron la concentración de Cd de tejido foliar y radicular, parámetros químicos y microbiológico de suelo. La amplificación de la secuencia del ARNr 16S correspondió a 1500 pb el porcentaje de similitud presentaron las cepas M-01 (*E. Hormaechei*) 86,17%, M-04 (*S. marcescens*) 98,18%, M-05 (*E. asburiae*) y M-06 (*E. Hormaechei*). Los consorcios bacterianos M-01 + M-06 y M01 + M05 + M-06 incrementaron el porcentaje de pH y las UFC con valores de 8,40 y 33,90%, además las aplicaciones de microorganismos aumentaron las concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^-$  y  $\text{SO}_4^-$  (7,5, 8,4, 54,5% respectivamente) en comparación al control respectivamente. Finalmente, la aplicación de las cepas individuales M-01, M-05 y M-06 redujeron el contenido y concentración de Cd con valores de 22 y 31,5 % respectivamente. El uso de cepas nativas de cacaoteras es una alternativa para la recuperación de suelos contaminados con Cd.

**Palabras claves:** Compatibilidad, consorcio bacteriano, AUP, PCR.

## ABSTRACT

Cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) is one of the most localized toxic metals in the environment, released by industries, machinery, agrochemicals and human activity, causing crops such as *T. cacao* to absorb and transport it to the almonds, causing health problems for consumers. The use of cadmium tolerant bacteria (BtCd) reduces the absorption of Cd in cocoa, due to its different immobilization mechanisms such as: biomineralization, biolixiviation and biosorption. The present research was carried out in the laboratory of Microbiology and Molecular Biology of the Quevedo State Technical University "UTEQ" and in the growth chamber and laboratory of the Department of Soil and Water Management (DMSA) of the Pichilingue Tropical Experimental Station (EETP). The objectives of the study were to molecularly characterize BtCd and evaluate its bioremediation capacity in cocoa soil in the province of "El Oro". To The province of Manabí were 16S rRNA sequenced and compared with the NCBI platform. To determine the variations in Cd uptake by BtCd application, a completely randomized block design (CRBD) was used, where the Neubauer method was applied to 100 g of soil and the Cd concentration of leaf and root tissue, chemical and microbiological parameters of the soil were determined. The amplification of the 16S rRNA sequence corresponded to 1500 bp, the percentage of similarity presented the strains M-01 (*E. Hormaechei*) 86.17%, M-04 (*S. marcescens*) 98.18%, M-05 (*E. asburiae*) and M-06 (*E. Hormaechei*). The bacterial consortia M-01 + M-06 and M01 + M05 + M-06 increased the percentage of pH and CFU with values of 8.40 and 33.90%, also the applications of microorganisms increased the concentrations of  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^-$  and  $\text{SO}_4^-$  (7.5, 8.4, 54.5% respectively) compared to the control respectively. Finally, the application of individual strains M-01, M-05 and M-06 reduced the Cd content and concentration with values of 22 and 31.5%, respectively. The use of native strains of cocoa plants is an alternative for the remediation of soils contaminated with Cd.

**Key words:** Compatibility, bacterial consortium, AUP, PCR.

## INDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTO .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. HIPÓTESIS .....	14
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo General.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. MARCO TEÓRICO .....	15
4.1. Metales pesados.....	15
4.2. Cadmio.....	15
4.3. Iones del suelo .....	15
4.3.1. Aniones.....	15
4.3.2. Cationes .....	15
4.4. Fuentes de contaminación de cadmio.....	16
4.5.1. Seres humanos .....	16
4.5.2. Plantas.....	16
4.6. Cacao .....	17
4.6.1. Problemas de cadmio en suelos cacaoteros .....	17
4.6.2. Normativas y regulación sobre el contenido de cadmio en el grano .....	17
4.7. Técnicas de remediación de suelos.....	18
4.7.1. Lavado de suelos .....	18
4.7.2. Estabilización/solidificación.....	18

4.7.3. Fitorremediación.....	19
4.7.4. Biorremediación .....	19
4.7.5. Electrorremediación.....	19
4.8. Bacterias tolerantes al cadmio (BtCd) .....	20
4.8.1. Mecanismos de las BtCd sobre el cadmio .....	20
4.8.1.1. Mecanismo pasivo .....	20
4.8.1.2. Mecanismo activo.....	20
4.8.2. Formas de inmovilización de Cd por las BtCd.....	20
4.8.2.1. Biosorción.....	21
4.8.2.2. Bioacumulación .....	21
4.8.2.3. Biolixiviación .....	21
4.8.2.4. Biomineralización.....	21
4.9. Caracterización Molecular.....	22
4.9.1. Extracción de ADN.....	22
4.9.2. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) .....	22
4.9.3. Gen CadA y CadR. ....	22
4.9.4. ARN ribosomal 16S.....	23
4.9.5. Secuenciación .....	23
4.10. Aspectos legales .....	23
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	24
5.1. Ubicación.....	24
5.2. Identificación a nivel de especie de las cepas bacterianas tolerantes al cadmio (BtCd) ..	24
5.2.1. Extracción de DNA.....	24
5.2.2. Amplificación, purificación, y secuenciación del Gen ARNr 16S .....	24
5.3. Detección mediante PCR el producto de amplificación del gen CadA y CadR de los aislados bacterianos tolerantes al cadmio (BtCd).....	25

5.3.1. Amplificación del Gen CadR.....	25
5.3.2. Amplificación del Gen CadA .....	26
5.4. Compatibilidad de BtCd .....	26
5.5. Absorción de Cd en plantas de arroz en presencia de BtCd .....	26
5.5.1. Variables evaluadas .....	27
5.5.1.1. Potencial de Hidrogeno (pH) y conductividad eléctrica (CE) de suelo.....	28
5.5.1.2. Determinación de Fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ), sulfatos ( $SO_4$ ), cloruros ( $Cl^-$ ) y bicarbonatos ( $HCO_3$ ) de suelo .....	28
5.5.1.3. Determinación de UFC $g^{-1}$ de suelo, materia seca (parte aérea y radical), concentración de Cd (parte aérea y radical), Contenido de Cd (parte aérea y radical).....	28
5.5.1.3.1. Determinación de UFC $g^{-1}$ .....	28
5.5.1.3.2. Materia Seca de parte radical y foliar .....	29
5.5.1.3.3. Concentración y contenido de cadmio.....	29
5.6. Análisis de varianza.....	29
6. RESULTADOS .....	31
6.1. Amplificación y secuenciación del ARN ribosomal 16S .....	31
6.2. Análisis filogenético del gen ARNr 16S .....	32
6.3 Amplificación de los genes Cad A y Cad R .....	33
6.4. Compatibilidad de bacterias tolerantes a Cadmio .....	33
6.5. Contenido de pH y CE del suelo y sistema radicular .....	34
6.6. Determinación del Peso seco radicular (PSR), foliar (PSF) y Unidades formadoras de colonias (UFC/g). .....	35
6.7. Contenido de bicarbonato Fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ), sulfatos ( $SO_4$ ), cloruros ( $Cl^-$ ) y bicarbonatos ( $HCO_3^-$ ) de suelo en suelo. ....	36
6.8. Concentración y contenido de cadmio foliar y radicular.....	37
6.9. Correlación de Pearson.....	38
6.10. Análisis de componentes Principales.....	41
7. DISCUSIÓN.....	43

8. CONCLUSIONES .....	47
9. RECOMENDACIONES .....	48
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
11. ANEXOS .....	58

## FIGURAS

<b>Figura 1</b> Amplificación del ARNr 16S mediante PCR. M, Lader 100 pb. Carriles: 1 a 4 fragmentos no purificados M-01, M-04, M-05, M-06. 5 a 9 fragmentos purificados M-01, M-04, M-05; M-06. 5 y 10 control con agua. ....	31
<b>Figura 2</b> Árbol filogenético de los aislados bacterianos basados en la secuenciación del gen ARNr 16S. El árbol filogenético se basó al método Neighbour-joining, las distancias evolutivas se basaron a Kimura 2-parámetro. Distancias horizontales son proporcionales.....	32
<b>Figura 3</b> Efecto de las BtCd en la materia seca de <i>Oryza sativa</i> y UFC del suelo. ....	36
<b>Figura 4</b> Análisis de componentes principales de las variables en estudio. pH riz (pH de rizósfera); CE riz (Conductividad eléctrica de rizósfera); pH suelo (pH de suelo); CE suelo (Conductividad eléctrica de rizósfera); PSR (Peso seco radicular); HCO <sup>3-</sup> (Bicarbonato); SO <sub>4</sub> (sulfato); Cl-(cloruros); PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (fósforo); PSH (peso seco de la hoja); Conc Cd foliar (Concentración de cadmio foliar); Conc Cd radicular (Concentración de cadmio radicular); Cont Cd foliar (Contenido de cadmio foliar); Cont Cd raíz (Contenido de cadmio radicular); UFC g <sup>-1</sup> (Unidades formadoras de colonia por gramo). Las letras representan las cepas bacterianas utilizadas. A (M-01), B (M.04), C (M-05), D (M-06), las letras en conjunto son los consorcios bacterianos. ....	42

## TABLAS

<b>Tabla 1</b> Procedencia de las cepas bacterianas tolerantes al Cd. ....	24
<b>Tabla 2</b> Tratamientos aplicados y concentración de BtCd en el estudio de variación de absorción de Cd en plantas de arroz. MDC representa el 25% de medio de cultivo. ....	27
<b>Tabla 3</b> Esquema de varianza.....	30
<b>Tabla 4</b> Caracterización de los aislados bacterianos al compararse por GenBank de NCBI. .	31

<b>Tabla 5</b> Cuadro de compatibilidad entre bacterias Compatibilidad: (+) Incompatibilidad: (-), (la flecha roja indica el sinergismo de las bacterias). .....	33
<b>Tabla 6</b> Efectos de la aplicación de bacterias tolerantes de cadmio (BtCd) en diferentes parámetros químicos de suelo.....	34
<b>Tabla 7</b> Efectos de la aplicación de bacterias tolerantes de cadmio (BtCd) en diferentes variables morfológicas de la planta y microbiológica de suelo. ....	35
<b>Tabla 8</b> Efectos de la aplicación de bacterias tolerantes de cadmio (BtCd) en diferentes parámetros químicos del suelo.....	37
<b>Tabla 9</b> Efectos del empleo de bacterias tolerantes a cd en concentración y contenido de cadmio foliar y radicular.....	38
<b>Tabla 10</b> Correlaciones entre las variables química-biológica del suelo y planta. Los asteriscos en las cuadrículas indican correlaciones de Pearson significativas: *P < 0,05, **P < 0,01, *** P > 0,001. ....	40