



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS ACUMULADORAS DE BORO EN SUELOS
CULTIVADOS CON BRÓCOLI EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI-ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía
PhD. Vivian Morera Córdova

Autora
Karen Marcela Vásquez Bautista

Año
2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Vivian Morera Córdova
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 1756346811

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Karen Marcela Vásquez Bautista
CI: 0502638828

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, a mi familia y amigos por su amor y su apoyo incondicional. A mi profesora guía MSc. Zayda Piedad Morales, por su dedicación y su valiosa guía durante mi proyecto de tesis, a la MSc. Karla Garcés por permitirme realizar el trabajo experimental dentro de las instalaciones de su empresa Agrodiagnostic; a la Ing. Gabriela Arregui por su apoyo y colaboración; al Ing. Germán Espinosa, por permitirme tomar muestras en la hacienda Santa Isabel de su propiedad y brindarme información de la misma.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios que gracias a Él todo es posible, a mis padres Ramiro y Marcela que son los pilares fundamentales en mi vida, que con su amor y sacrificio han logrado darme lo mejor para cumplir mis metas; a mis hermanos Mabel y Ramiro quienes con su apoyo y consejos me ayudan cada día a ser una mejor persona, a mi hermana Pauli que desde el cielo me bendice y me ayuda a salir adelante, a todos mis amigos y familiares por motivarme a ser mejor en el ámbito personal y profesional.

RESUMEN

El acelerado crecimiento de la población humana, ha incentivado el aumento de actividades agrícolas que conllevan consecuencias, un ejemplo es el uso indiscriminado de plaguicidas y fertilizantes químicos; elevándose así las probabilidades de impactos negativos en los ecosistemas. El boro es un micronutriente que se encuentra dentro de los fertilizantes comerciales necesarios para el óptimo desarrollo de los cultivos. Cuando el boro excede su concentración máxima en el suelo (1 - 9 ppm), dependiendo del cultivo, éste se vuelve tóxico provocando un problema agrícola y medio ambiental. El impacto de concentraciones excesivas de este metaloide, se ve reflejado en la reducción de la calidad del suelo, su funcionalidad y rendimiento; afectando a las cosechas. En este estudio, con el propósito de identificar un método para reducir las altas concentraciones de boro en suelos agrícolas, se aisló e identificó cepas bacterianas que acumulan dicho elemento, a partir de muestras de suelos provenientes de cultivos de brócoli en la localidad de Poaló, Provincia de Cotopaxi. Cuarenta colonias bacterianas fueron escogidas inicialmente, exponiéndolas a concentraciones entre 4 - 750 ppm de boro en agar Luria Bertani (LB), donde finalmente las cinco cepas más tolerantes fueron seleccionadas para las pruebas de bioacumulación e identificación bioquímica enzimática. Las bacterias clasificadas en este estudio con códigos de aislamiento: BorA16, BorB27, BorB29, BorC310 y BorD46, toleraron niveles de concentración de boro de al menos 750 ppm y fueron capaces de bioacumular un 55%, 57.5%, 62.5%, 37.5% y 55% respectivamente, de la concentración a la cual fueron expuestas. Los resultados obtenidos del análisis de los perfiles bioquímicos, evidencian que las bacterias seleccionadas podrían pertenecer a los géneros: *Bacillus* spp., *Brevibacterium* spp. y *Pseudomonas* spp.; además podrían considerarse útiles y adecuadas para la biorremediación de suelos de cultivo afectados por la contaminación de boro en exceso.

ABSTRACT

The rapid population growth has spurred the increased agricultural activities with consequences involved such as the indiscriminate use of pesticides and chemical fertilizers; raising negative impacts on ecosystems. Boron is a micronutrient needed in commercial fertilizers for optimal crop development. When the boron concentration exceeds the maximum on the soil (1 to 9 ppm), depending on the crop, it becomes toxic causing environmental and agricultural problems. The impact of excessive concentrations of this metalloid is reflected in reducing soil quality, functionality and performance. In this study, in order to identify a method to reduce high boron concentrations in agricultural soils, bacterial strains that accumulate this element were isolated and identified from broccoli crops soil samples in Poaló town, Cotopaxi – Ecuador. Forty bacterial were initially chosen and exposed to boron concentrations between 4 and 750 ppm in Luria Bertani (LB) agar, and finally only five strains were selected to test bioaccumulation and biochemical enzymatic identification. BorA16, BorB27, BorB29, BorC310 and BorD46 that tolerate boron concentration levels of at least 750 ppm, and bioaccumulated 55%, 57.5%, 62.5%, 37.5% and 55% ppm respectively, of the concentration at which were exposed. Results of this analysis show that selected bacteria could belong to the genera: *Bacillus* spp, *Brevibacterium* spp. and *Pseudomonas* spp., and that they could be considered suitable for bioremediation of agricultural soils affected by excessive boron concentration levels.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes	2
Planteamiento del problema.....	4
Hipótesis de la investigación	4
Alcance	5
Justificación	5
Objetivos	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
1. CAPÍTULO I: MARCO REFERENCIAL.....	8
1.1 Brócoli.....	8
1.1.1 Generalidades del brócoli.....	8
1.1.2 Brócoli en el Ecuador	9
1.2 Boro.....	11
1.2.1 Generalidades del boro	11
1.2.2 Boro en el suelo	11
1.2.3 Boro en las plantas.....	12
1.2.4 Deficiencia de boro en el desarrollo de las plantas	13
1.2.5 Toxicidad de boro en el desarrollo de las plantas	14
1.2.6 Boro en las bacterias.....	14
1.3 Bioacumulación.....	16
1.3.1 Elementos que afectan a la bioacumulación	16
1.3.2 Bioacumulación Bacteriana.....	17
1.3.3 Biosorción bacteriana.....	18
1.3.4 Interacción superficial bacteriana con los metales	18
2. CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	20
2.1 Participantes	20

2.2 Fase de campo.....	21
2.2.1 Área de muestreo.....	21
2.2.2 Recolección de suelos	21
2.3 Fase de laboratorio	24
2.3.1 Medición del porcentaje de humedad de las muestras de suelo (Norma AASHTO T-93)	24
2.3.2 Aislamiento de bacterias acumuladoras de boro.....	24
2.3.3 Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.....	25
2.3.4 Identificación de las bacterias seleccionadas.....	26
2.3.5 Determinación de la tolerancia a altas concentraciones de boro	27
2.3.6 Estimación de la bioacumulación de boro	27
2.3.7 Identificación bioquímica de las cepas escogidas	29
2.4 Análisis estadísticos	30
3. CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	31
3.1 Análisis físico químico de los suelos	31
3.2 Aislamiento de colonias a partir de suelos cultivados con brócoli	33
3.3 Determinación de la tolerancia a altas concentraciones de boro	36
3.4 Evaluación de la bioacumulación de boro de las cepas aisladas de suelos cultivados con brócoli	38
3.5 Caracterización de las cepas obtenidas a través de pruebas bioquímicas	39
4. CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	41
4.1 Análisis físico químico de los suelos	41
4.2 Aislamiento de colonias a partir de suelos cultivados con brócoli	42
4.3 Determinación de la tolerancia a altas concentraciones de boro	42

4.4 Evaluación de la bioacumulación de boro y caracterización a través de pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de suelos cultivados con brócoli	43
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1 Conclusiones.....	48
5.2 Recomendaciones	48
REFERENCIAS	50
ANEXOS	66

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, la exportación de brócoli en el 2014 alcanzó las, 17.321 toneladas, al valor FOB (Franco a bordo) de 25,9 millones de dólares. Se constituye un principal producto agrícola, dentro de los productos no tradicionales (MAGAP, 2015). El brócoli (*Brassica oleracea* L.) es una hortaliza con alto valor nutritivo debido a la gran cantidad de vitamina C, K, A y fibras solubles que posee. Estudios recientes aseguran que tiene propiedades anticancerígenas (Moon, Kim, Ahn, y Shibamoto, 2010). Para su óptimo crecimiento el brócoli requiere de fertilizantes y pesticidas químicos, dentro de los cuales se encuentran micronutrientes importantes tales como el boro, nitrógeno, potasio, azufre y calcio (Aguirre, 2013).

El boro es un micronutriente esencial que desempeña un papel fundamental en los procesos fisiológicos vegetales (Alarcón, 2001; Ganie et al., 2013). El brócoli necesita concentraciones de este micronutriente para su óptimo crecimiento, si la concentración de boro en el suelo es menor de 0,5 ppm, se le considera deficiente y si es mayor a 1,0 ppm puede llegar a ser tóxico. El intervalo entre la toxicidad y la deficiencia de los niveles de boro en el suelo es muy estrecho (Batabyal, Sarkar y Mandal, 2015).

La toxicidad del boro representa un problema agrícola importante, el cual limita la productividad de los cultivos. Los síntomas típicos mostrados por cultivos comerciales expuestos a altas concentraciones de boro son: necrosis foliar, retraso de su desarrollo normal, tallo hueco, disminución en el tamaño, número y peso de frutos (Cervilla et al., 2012).

Una de las tecnologías utilizadas para la remoción de contaminantes provenientes de las actividades industriales, es la investigación de microorganismos, que se basa en el estudio de la biodiversidad de un determinado territorio con el fin de encontrar comunidades de interés biotecnológico. Los microorganismos estudiados, tienen gran importancia

debido a que son confiables, económicos, pueden utilizarse a gran escala en menor tiempo y son fáciles de manipular (Rittmann, 2006).

Antecedentes

Actualmente la Biotecnología es utilizada en muchos sectores agrícolas e industriales, debido a la gran cantidad de aplicaciones y beneficios que posee y permite solucionar problemas ambientales y antrópicos, utilizando técnicas amigables con el medio ambiente (Castillo et al., 2005).

Hoy en día, la Biotecnología Ambiental ha progresado a pasos agigantados, debido a avances científicos y tecnológicos en el ámbito de biorremediación. Ésta se basa en el tratamiento de aguas residuales, lodos, suelos o sedimentos, eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el medio ambiente y el desarrollo de una tecnología renovable de energía y agua (Rittmann, 2006).

Las industrias agrícolas utilizan contaminantes orgánicos persistentes, los cuales se clasifican en: organoclorados, pesticidas, fertilizantes, insecticidas, herbicidas entre otros, que en algunos casos son vertidos al medioambiente de manera indiscriminada causando efectos negativos a la biodiversidad, donde la mayoría puede bioacumularse en los seres vivos y en el ambiente (Geiger et al., 2010)

Dentro de los fertilizantes y plaguicidas comerciales se encuentra el boro que es micronutriente esencial que requieren los cultivos en pequeñas cantidades para su óptimo desarrollo (Ganie et al., 2013). Éste desempeña un papel fundamental en los procesos fisiológicos vegetales como: el transporte y la biosíntesis de azúcares, el mantenimiento de la pared celular, el metabolismo proteico, la síntesis del ARN, los procesos bioquímicos, la modulación de las actividades enzimáticas y las síntesis de sacarosa (Alarcón, 2001; Ganie et al., 2013). En Latinoamérica se han realizado varias investigaciones de organismos

y microorganismos, que tienen la capacidad de tolerar y bioacumular altas concentraciones de boro. En Brasil se realizó estudios con diferentes especies de plantas (Kenaf, Amaranto, Mostaza y Rábano) que movilizan y bioacumulan Zn, Cu, Mn, Pb y B. Sin embargo, la problemática de esta técnica es que el tiempo de biorremediación aproximado es de seis años o más, con un 50% de efectividad en la remoción. (Santos, Rodella, Abreu y Coscione, 2010).

Un estudio realizado por Moraga, Poma, Amoroso y Rajal (2014) del Instituto de Investigaciones para la Industria Química de Argentina, aisló cepas pertenecientes al género *Streptomyces* y *Actinomyces* con capacidad de tolerar hasta 4.757 ppm de boro, cuyo objetivo fue remover de suelos mineros contaminados a dicho elemento.

Por otro lado en Japón, se han realizado varias investigaciones de microorganismos con la capacidad de tolerar y bioacumular boro, las cepas obtenidas fueron *Variovorax boronicumulans* (Miwa, Ahmed, Yoon, Yokota y Fujiwara, 2008), *Bacillus boroniphilus*, *Gracilibacillus boraciitolerans*, *Chimaericella boritolerans* y *Lysinibacillus boronitolerans* con capacidad de tolerar 4.865, 4.865, 3.243 y 1.621 ppm de boro, respectivamente (Ahmed, Yokota y Fujiwara, 2007a, b, c, d). En otro estudio realizado por Raja y Omine (2012a), identificaron *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* (2) y *Bacillus pumilus* con un total de bioacumulación de 0.1; 2.3; 1.5 y 4.7 ppm de boro.

En el Ecuador según datos de (MAGAP, 2015) a partir del año 2005, ya existían estudios sobre herramientas biológicas para emplear en el campo agrícola, con el fin evitar la utilización de plaguicidas y fertilizantes químicos nocivos para el medio ambiente. En la actualidad, existe poca información sobre investigaciones enfocadas en la búsqueda de microorganismos que bioacumulen y reduzcan concentraciones de boro en suelos destinados para la agricultura.

Planteamiento del problema

El Ecuador, tiene 5'132.066 hectáreas de superficie agropecuaria donde el 52.59% utiliza fertilizantes y plaguicidas químicos. El sector agrícola utiliza un 38.14% de herbicidas, un 33,63% de fungicidas, un 23,69% de insecticidas y el 4% de otros plaguicidas (INEC, 2014).

El boro se encuentra en varios agroquímicos utilizados en el país, debido a que es un micronutriente esencial, que cumple funciones primordiales en la estructura de la pared celular, está relacionado con el mantenimiento de la membrana plasmática y varias rutas metabólicas (Camacho, Rexach y González-Fontes, 2008).

La toxicidad del boro se da cuando excede su concentración máxima en el suelo (1 - 9 ppm), ya sea por el exceso de fertilización o que el agua de riego contenga altos niveles de dicho elemento, provocando diferentes efectos en las plantas, tales como, reducción de la división celular de la raíz, metabolismo alterado, disminución de los niveles de lignina y suberina, entre otros (Camacho et al., 2008; Kabata-Pendias, 2011).

El impacto de las concentraciones excesivas de boro, se ve reflejado en la reducción de la calidad del suelo, su funcionalidad y rendimiento, con grave afectación a las cosechas. Por esta razón plantea obtener cepas de bacterias acumuladoras de boro, para reducir las elevadas concentraciones de dicho elemento en el suelo.

Hipótesis de la investigación

Existen bacterias acumuladoras de boro en suelos cultivados con brócoli, localizados en la parroquia Poaló del cantón Latacunga provincia de Cotopaxi.

Alcance

El alcance de este trabajo de titulación consiste en aislar cepas bacterianas en suelos con elevadas concentraciones de boro, para obtener cepas acumuladoras de dicho elemento. Este podría ser utilizado a largo plazo, para la reducción de altas concentraciones de boro en cultivos de pequeñas industrias brocoleras de la región.

Justificación

En nuestro país, la industria brocolera ha crecido de manera acelerada desde los años 80, donde el brócoli se ha convertido en uno de los productos más apetecidos en los mercados internacionales, debido a la cantidad de beneficios que este posee (Perfil del Brócoli en el Ecuador, 2009). El auge de la comercialización del brócoli inició en los años noventa en la Sierra ecuatoriana. A este cultivo se le nominó como un producto estrella en el año 2007, convirtiéndose en el segundo producto no tradicional de exportación después de las rosas (Le Gall, 2009). Los mercados principales son: Estados Unidos, Japón, Alemania, Países Bajos y Suecia. Además se considera como una fuente importante de trabajo en las áreas rurales del Ecuador (MAGAP, 2015).

Al igual que todos los cultivos el brócoli necesita agroquímicos para su normal crecimiento. Lamentablemente existe una mala cultura por parte de los agricultores ecuatorianos, debido a que colocan los fertilizantes y plaguicidas sin realizar estudios previos de la composición físico química del terreno. Esto conlleva a un problema serio, debido a que ciertos macro y micronutrientes tienden a acumularse en el suelo sin poder ser solubilizados por las plantas.

En la actualidad, existen varias técnicas que se utilizan para la reducción o eliminación de contaminantes químicos en suelos y aguas tales como, la fitorremediación, la precipitación, el intercambio iónico, la filtración, la electrodiálisis reversible, la nanofiltración, la diálisis inversa, la oxidación, la adsorción, etc. Sin embargo, estas tienen varias desventajas, como son su

costo elevado; algunas necesitan de personal especializado, además requieren estudios de impacto ambiental, los resultados se obtienen en tiempos prolongados, entre otros (D'Ambrosio, 2005). Estas no se utilizan comúnmente en países subdesarrollados como el Ecuador.

Por esta razón se cree que la búsqueda de microorganismos acumuladores de boro podría ser una alternativa biotecnológica llamativa, que ayudaría a reducir el exceso de este micronutriente, aumentando la calidad y el rendimiento de suelos y evitando así pérdidas costosas al agricultor.

Objetivos

Objetivo General

Seleccionar cepas bacterianas acumuladoras de boro provenientes de suelos cultivados con brócoli en la provincia de Cotopaxi-Ecuador.

Objetivos Específicos

- Identificar los niveles de tolerancia al boro de las cepas bacterianas provenientes de suelos brocoleros con altos niveles de dicho elemento.
- Determinar la actividad bioacumuladora de las cepas bacterianas seleccionadas.
- Evaluar el perfil morfológico y bioquímico enzimático de las cepas bacterianas bioacumuladoras de boro para su identificación.

1. CAPÍTULO I: MARCO REFERENCIAL

1.1 Brócoli

1.1.1 Generalidades del brócoli

El brócoli (*Brassica oleracea*.L) es una hortaliza que se originó en el noroeste del Mediterráneo, posteriormente este cultivo se introdujo en Italia y en otros países de Europa Occidental donde se diversificó. Este producto se popularizó debido a sus importantes valores nutricionales (Ciancaleoni, Chiarenza, Raggi, Brancay Negri, 2013).

Se caracteriza por tener un color verde intenso, con varias cabezas florales carnosas en forma de árbol, sobre un tallo grueso comestible. Es un cultivo de clima cálido y fresco (Espinoza, 2014).

1.1.1.1 Variedades de brócoli

A nivel mundial existen muchas variedades de brócoli. Estas dependen del clima o del suelo en que se las siembre. Las variedades de brócoli que se encuentran en el mercado internacional son: Tradition, Legacy, Domador, Coronado, Avenger, Italiano, Shogun, entre otros. En el Ecuador las especies que más se produce son: Legacy y Avenger, debido a que se desarrollan en menor tiempo, lo que permite que el producto se comercialice más rápido (IICA, 2007; Alvarado et al., 2014).

1.1.1.2 Valor nutricional del brócoli

Se cree que uno de los principales beneficios que se tiene al consumir brócoli, es que reduce el riesgo de contraer cáncer, ya que es un vegetal crucífero con valores medicinales y nutricionales con alto contenido de proteínas, vitaminas, fito-nutrientes, antioxidantes carbohidratos y minerales. (FAO, 2006; Moon et al., 2010).

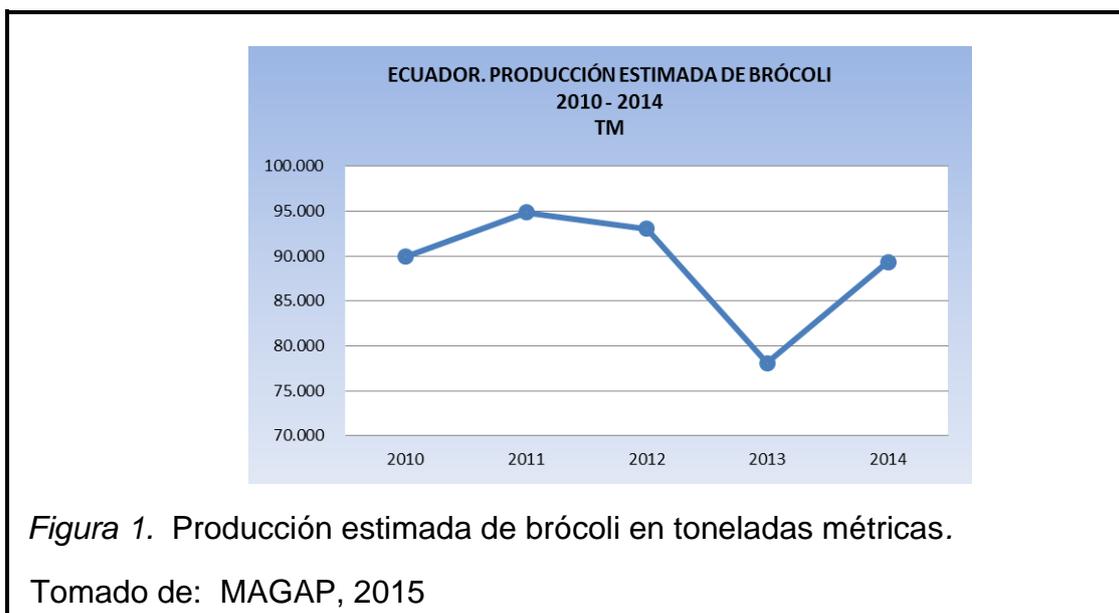
1.1.2 Brócoli en el Ecuador

El cultivo de brócoli en el Ecuador ha adquirido gran importancia al pasar de los años, en la década de los noventa el país empezó con una producción de 300 toneladas y en el año 2015 se llegó a 39.898 toneladas (MAGAP, 2015). La Sierra ecuatoriana presenta buenas condiciones ambientales, siendo esto una considerable ventaja frente a productores de otras partes del mundo. Una de ellas es que la temperatura permanece estable todo el tiempo, permitiendo que se den alrededor de tres cosechas al año (Manosalvas, 2012).

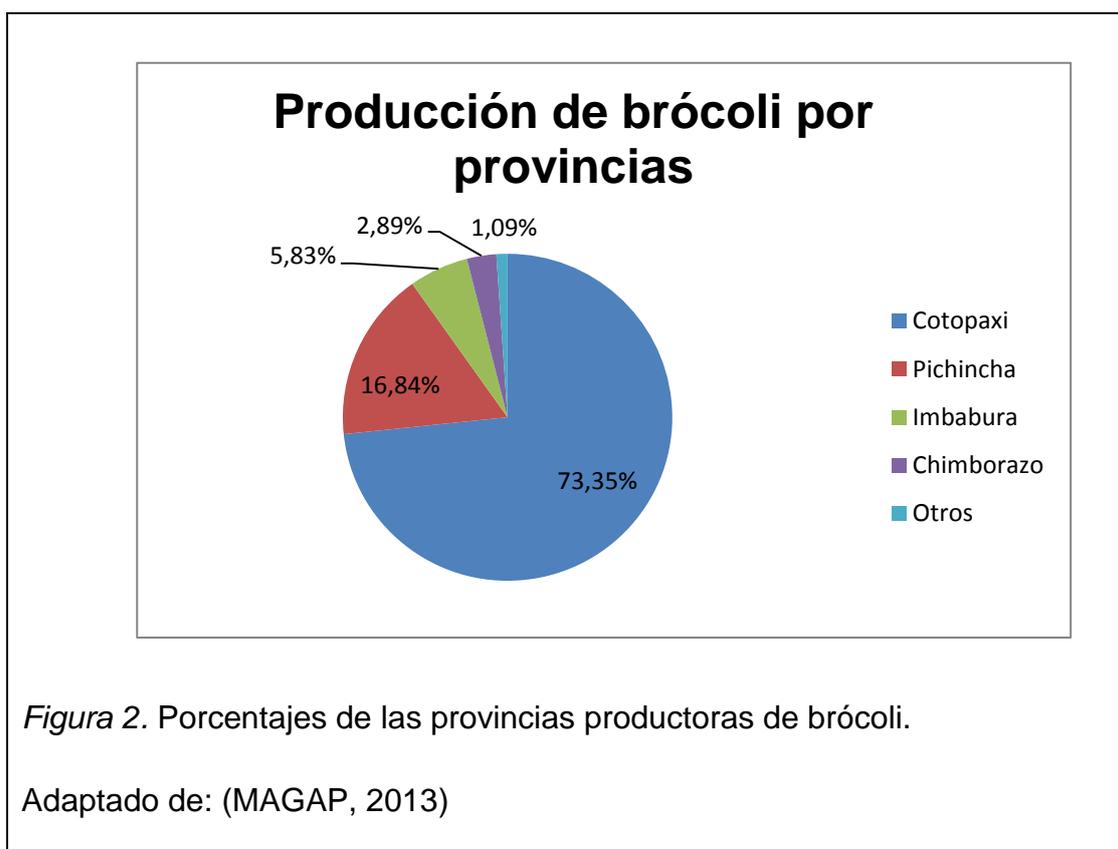
Este sector agrícola es uno de los principales generadores de empleo que ofrece el Ecuador. Se estima que genera 5.000 empleos directos y 15.000 empleos indirectos (Banco central del Ecuador [BCE], 2013). Según datos de la Asociación de Productores Ecuatorianos de Frutas y Legumbres, los empleos generados por la cadena productiva del brócoli, se dividen en tres partes importantes dentro de la fase primaria (siembra, cosecha y post-cosecha).

1.1.2.1 Producción de brócoli en el Ecuador

En la figura 1, Se observa la estimación de la producción de brócoli ecuatoriano en toneladas métricas desde en el año 2010 hasta el año 2014.



El brócoli en el Ecuador representa una importante alternativa agrícola de exportación en la región Sierra. La provincia de Cotopaxi tiene la mayor producción de este cultivo con 51.350 tm, Pichincha es la segunda provincia con 11.791 tm, seguida de Imbabura con 4.080 tm y Chimborazo con 2.018 tm, donde esta última provincia generalmente destina el brócoli al mercado nacional (MAGAP, 2013). La figura 2, indica la estimación de la producción anual en porcentajes de cada provincia.



1.1.2.2 Exportación del brócoli en el Ecuador

Las condiciones climáticas favorables en las provincias productoras, hizo que la producción nacional aumente en 59,59% en el año 2014, con respecto al año 2013 (MAGAP, 2014). En el Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones del Ecuador, se cita como valedero el dato de la Asociación de Productores Ecuatorianos de Frutas y Legumbres-APROFEL, referente a que el 65% del brócoli producido en Ecuador, es exportado a mercados de EEUU, Europa y Japón. (PROECUADOR, 2016).

1.2 Boro

1.2.1 Generalidades del boro

El boro es un elemento metaloide refractario, que se encuentra distribuido naturalmente en el medio ambiente. Es difícil obtener este elemento puro debido al elevado punto de fusión (3.400 K) por lo cual en la naturaleza se encuentra en forma compuesta (bórax , ácido bórico o borato). Se utiliza en varios productos, tales como fibras de vidrio de borosilicato, retardantes de fuego, cosméticos, antisépticos, fertilizantes y pesticidas agrícolas (Kabata-Pendias et al., 2011).

Este elemento se libera al medio ambiente de diferentes maneras, normalmente a través de la quema de residuos agrícolas, desechos de las industrias de vidrio; en el procesamiento de bórax y otros compuestos similares, en la lixiviación de papel, en las industrias generadoras de energía y en las plantas químicas. Una parte importante, se origina de la erosión de las rocas (Ozturk, Sakcali, Gucel y Tombuloglu, 2010).

Este elemento es un micronutriente esencial para el crecimiento normal de los cultivos, pero el rango entre lo deficiente y lo tóxico es estrecho, por lo cual se debe tomar en cuenta el tipo de suelo y de cultivo, para no provocar efectos negativos en la productividad de las plantas (Smith, Grattan, Grieve, Poss y Suarez, 2010).

1.2.2 Boro en el suelo

En suelos, al boro se le considera como un elemento móvil entre los micronutrientes, normalmente se encuentra en concentraciones deficientes en la mayoría de suelos, sin embargo en algunas regiones áridas y semiáridas este metaloide puede estar en altas concentraciones.

Se lo encuentra también debido al exceso de fertilización o al uso de aguas de riego contaminadas, lo que causa problemas agrícolas (Kabata-Pendias, 2011).

Existen más de 200 tipos de minerales que contienen boro pero solo cuatro son de importancia comercial; el bórax, la ulexita, la kernita y el ácido bórico se extraen de manera masiva. En la agricultura se utiliza ácido bórico y bórax como fertilizantes y se aplica directamente al suelo o de manera foliar (Parks y Edwards, 2005).

1.2.3 Boro en las plantas

El ácido bórico no disociado es la forma más abundante de boro en el suelo. Dependiendo de la disponibilidad de dicho elemento, la absorción por la raíz se da por tres formas distintas: difusión pasiva a través de la bicapa lipídica, por proteínas integrales de membrana (NIP5;1) o con el uso de transportadores (BOR) (Tanaka y Fujiwara, 2008).

El boro es esencial para la estructura de la pared celular en plantas, debido a que este elemento forma ésteres de borato en la dimerización de dos moléculas de Ramnogalacturonano II (RG-II) a través de los residuos de apiosa, como lo muestra la Figura 3. Este complejo interviene en la regulación del tamaño de los poros y evita rupturas en la pared (Camacho et al., 2008).

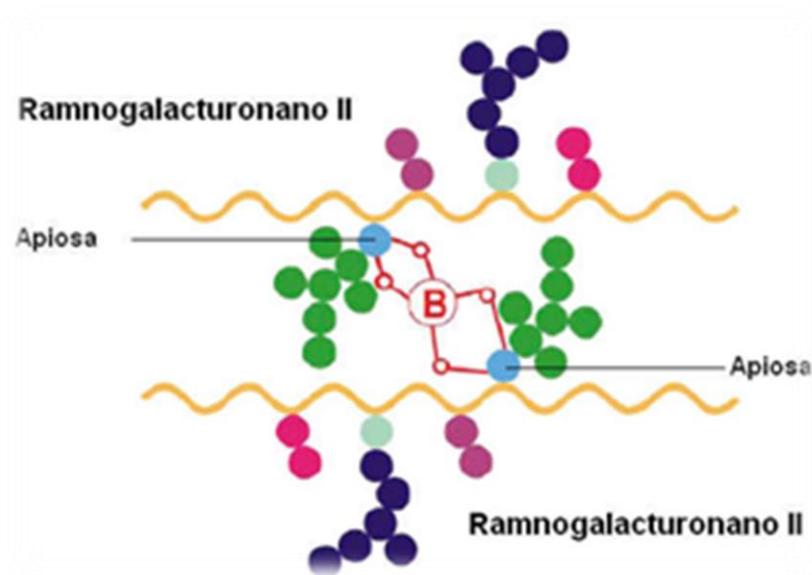


Figura 3. Representación de la unión de dos moléculas de Ramnogalacturonano II a través de un puente borato.

Tomado de Acuña y Molina, 2007

Otros procesos principales donde el boro está involucrado, es en el mantenimiento de las funciones normales de la membrana además de ser un cofactor de los procesos metabólicos (Acuña et al., 2007).

1.2.4 Deficiencia de boro en el desarrollo de las plantas

El boro es un compuesto muy soluble que se filtra fácilmente en suelos de textura ligera en zonas de alta precipitación y deja de estar disponible para las plantas. La deficiencia de boro en los suelos puede afectar considerablemente a los tejidos reproductivos y por ende a todo el ciclo de reproducción (Reid, 2014).

Estudios realizados demuestran que la deficiencia de boro afecta de manera negativa el funcionamiento de la membrana (Blaser-Grill, Knoppik, Amberger, y

Goldbach, 1989), reduciendo las actividades de la ATPasa e inhibiendo la actividad de la enzima Fe-reductasa. También se ha demostrado que puede causar disminución en las actividades de la óxido-reductasa (Acuña et al, 2007; Ferrol y Donaire, 1992).

Los síntomas físicos que se pueden observar, es un crecimiento anormal de frutos y hojas, caída prematura de semillas y una severa afectación a los meristemas terminales, provocando plantas pequeñas y no productivas (Ganie et al., 2013).

1.2.5 Toxicidad de boro en el desarrollo de las plantas

El boro tiende a acumularse y volverse tóxico en zonas de baja precipitación, provocando impactos negativos en la productividad de los cultivos en muchas zonas agrícolas del mundo (Yau y Ryan, 2008). En las plantas, la exposición a altas concentraciones causa reducción en la división celular de la raíz, daños oxidativos y alteración del metabolismo, desencadenando un problema agrícola (Sakamoto et al., 2011).

Los síntomas visibles de la toxicidad en plantas se presentan como; muerte de los brotes más jóvenes, secreción de resina y quemaduras en las puntas de las hojas y lesiones corchosas de color café en el tallo (Acuña et al., 2007).

1.2.6 Boro en las bacterias

En las bacterias, se ha encontrado que el boro cumple funciones biológicas importantes en el mecanismo de comunicación bacteriano o “quorum sensing”, este mecanismo es considerado como una forma de comunicación intracelular, que ayuda a regular la expresión génica dependiendo de la densidad poblacional. Este proceso sistematiza una amplia gama de actividades fisiológicas, como la expresión de factores de virulencia, la producción de antibióticos y la formación de biopelículas (Miller y Bassler 2001; Waters y Bassler, 2005).

Estos mecanismos de comunicación, se llevan a cabo a través de moléculas de señalización denominadas autoinductores, presentes en todas las bacterias (Marcos et al., 2011). Las principales moléculas señalizadoras de *quorum* para bacterias Gram positivas son péptidos cortos con o sin modificaciones, las bacterias Gram negativas utilizan las *N*-acil homoserín lactonas (AHLs) y el diéster furanosil borato (AI-2) es utilizado por ambas (Chen et al., 2002; Romero y Otero, 2010).

El diéster furanosil borato (AI-2) (figura 4) necesita de concentraciones de boro para su correcto funcionamiento, fue identificado por primera vez en *Vibrio harveyi*, se localiza en todas las bacterias considerándose como un lenguaje químico universal (Chen et al., 2002).

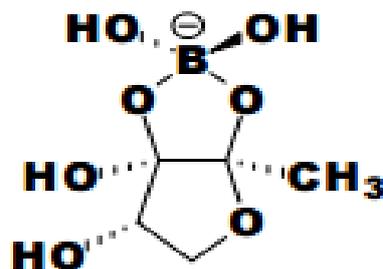


Figura 4. Diéster furanosil borato autoinductor en la detención del quorum.

Tomado de Romero et al., 2010.

El boro cumple una función importante en las bacterias del género *Azotobacter* debido a que este ayuda a su crecimiento y es requerido para la fijación de nitrógeno (Anderson y Jordan 1961), mientras que la cianobacteria *Anabaena* sp. utiliza para crecer en condiciones deficientes de nitrógeno (Mateo et al., 1986). Se ha demostrado que el boro en forma de ácido bórico, puede ser utilizado para la composición de la membrana bacteriana y también como un mecanismo de transporte de proteínas o compuestos orgánicos (Miwa et al., 2009).

El *Bacillus boroniphilus* sp nov., necesita determinadas concentraciones de boro en el medio, para un crecimiento adecuado. Sin embargo se desconoce el comportamiento de dicho elemento en el metabolismo de la bacteria (Ahmed et al., 2007a). *Lysinibacillus boronitolerans*, *Gracilibacillus boraciitolerans* sp. nov., *Rhodococcus erythropolis*, *Variovorax boronicumulans* sp.nov. y *Pseudomonas Shewanella*, son ejemplos de bacterias estudiadas por su capacidad de tolerar y acumular boro (Ahmed et al., 2007d; Ahmed et al., 2007b; Miwa et al., 2009; Miwa et al, 2008).

1.3 Bioacumulación

La bioacumulación, se define como un mecanismo de absorción y retención de productos químicos, en los organismos vivos a través del tiempo. Estos productos tienden a alcanzar concentraciones altas, a medida que avanza el nivel en la cadena alimentaria (Mackay y Fraser, 2000). Estos químicos tienden a moverse de forma pasiva, de zonas de altas concentraciones a bajas concentraciones, por medio del potencial químico, permitiendo el ingreso al organismo vivo (Kamrin, 1997).

El potencial químico en los procesos de bioacumulación, aumenta o disminuye dependiendo de la sustancia química, es decir si dicha sustancia es hidrofóbica o lipofílica tiende a moverse fuera del agua y entrar a las células del organismo, alojándose en microambientes lipofílicos (Fisk, Norstrom, Cymbalisty y Muir, 1998; Kamrin, 1997). Además la sustancia química debe resistir a la degradación, en los procesos de biotransformación metabólica, que se da en cada organismo vivo (Drouillard et al., 2003).

1.3.1 Elementos que afectan a la bioacumulación

Existen varios factores que afectan a este mecanismo. Todo va a depender principalmente de la sustancia química, puesto que esta puede unirse a sitios específicos intracelularmente y quedarse por un tiempo prolongado o moverse

libremente dentro o fuera del organismo. El tiempo de captación y la eventual eliminación pueden afectar directamente a la bioacumulación, debido a que estas sustancias pueden ser eliminadas inmediatamente, sin pasar por ningún proceso metabólico. Otro factor importante es el tiempo de exposición de un organismo, debido a que este puede estar en ambientes, donde la sustancia química puede variar su concentración continuamente en el tiempo (Agarwal, 2005).

Este mecanismo varía entre organismos de diferentes especies, es decir si un organismo es más grande, con mayor cantidad de tejido graso, con un metabolismo lento y una tasa de vida larga, tiende a bioacumular más que organismos pequeños de vida corta (Agarwal, 2005).

1.3.2 Bioacumulación Bacteriana

Hoy en día, la bioacumulación y la biosorción son herramienta viables e importantes utilizadas para la descontaminación de metales tóxicos de aguas, sedimentos y suelos utilizando microorganismos (Velásquez y Dussan, 2009).

La bioacumulación es un proceso que describe la absorción de una sustancia vital o tóxica en el microorganismo, este mecanismo utiliza un sistema de transporte de membrana dependiente de energía (Malik, 2004; Rosca et al., 2015; Vullo, 2003). Una vez internalizado el metal en el citoplasma, este es secuestrado por proteínas llamadas metalotioneínas o puede ser compartimentalizado dentro de la vacuola (Vullo, 2003).

Los metales acumulados en las células, pueden transformarse en compuestos menos tóxicos, gracias a diferentes complejos enzimáticos (Silver. 1994). Las proteínas metalotioneínas, son ampliamente distribuidas en los organismos, estas poseen grupos sulfhidrilo, se unen fácilmente a los iones metálicos esenciales y no esenciales en el citoplasma, (Brambila y Lozano 1999), las bacterias utilizan estas proteínas en los procesos de bioacumulación de metales (Suárez y Reyes, 2002).

1.3.3 Biosorción bacteriana

Este método biológico, es considerado como una alternativa sostenible y económicamente viable, debido a que explota las diferentes capacidades que tienen diversos organismos (hongos, bacterias y plantas), para inmovilizar, eliminar o reducir concentraciones tóxicas de metales pesados (Jamali, Ghaderian y Karimi, 2014).

La biosorción es un mecanismo metabólicamente independiente que se utiliza para la recuperación, la inmovilización y la eliminación de metales tóxicos que están presentes en el medio ambiente. Este proceso utiliza mecanismos fisicoquímicos para la retención de metales, por ligandos presentes en la superficie celular de la biomasa microbiana viva o muerta. La biomasa actúa como un intercambiador iónico de origen biológico. Actualmente la biosorción se considera una herramienta biotecnológica de limpieza rentable para disminuir eficientemente altas concentraciones de metales tóxicos, en aguas o suelos estudiada en algunos trabajos de biorremediación (Ahluwalia y Goyal 2007; Cañizares, 2000; Fomina y Gadd 2014; Sandoval, 2006).

1.3.4 Interacción superficial bacteriana con los metales

Las interacciones en la superficie celular ocurren por atracción electrostática entre los grupos funcionales cargados negativamente de la superficie bacteriana (amino, fosfato, carboxilo, hidroxilo) y los iones metálicos. Las bacterias Gram positivas van a tener mayor afinidad a los metales que las Gram negativas, debido a las diferencias en la estructura de la pared celular. Esto se da debido a las cadenas de peptidoglicanos y ácido teicoico que contienen grupos aniónicos como el carboxilo y el fosfato respectivamente expuestos directamente al ambiente, mientras que en las Gram negativas los peptidoglicanos se encuentran en menor escala y no están expuestos ya que están recubiertos de una membrana celular externa (Gadd, 1990; Suárez et al., 2002).

Algunas bacterias han demostrado estar cubiertas por una superficie proteica llamada capa S, es la parte más externa de la superficie bacteriana conformada por proteínas o glicoproteínas que se autoensamblan alrededor de la bacteria capaz de unirse a altas cantidades de iones metálicos (Sleytr, Györvary y Pum, 2003).

Uno de los problemas medioambientales más importantes es la contaminación que se produce por residuos de metales tóxicos liberados en el medio ambiente, llegando a constituir una amenaza potencial a los seres vivos. Por tal razón la biotecnología ambiental estudia métodos de bioprospección microbiana con el objetivo de implementar técnicas de detoxificación, remoción y recuperación de ambientes como suelo, agua y lodos, gracias a las diferentes interacciones que tienen las bacterias con los metales pesados y residuos tóxicos (Cañizares, 2000; Suárez et al., 2002).

2. CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

La figura 5, presenta un breve esquema de contenidos de la metodología empleada en este proyecto de titulación.

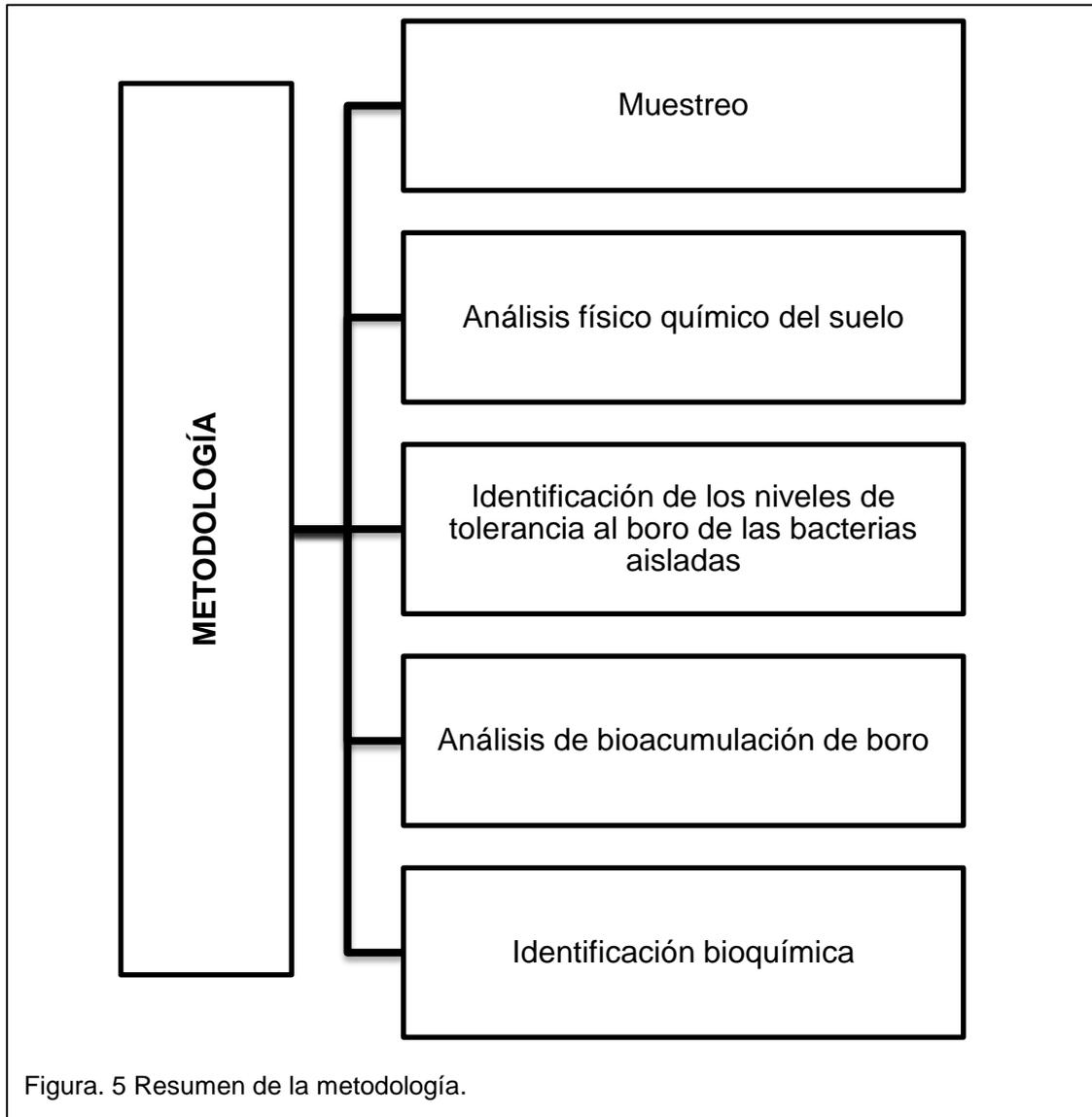


Figura. 5 Resumen de la metodología.

2.1 Participantes

El presente trabajo de titulación fue realizado en las instalaciones del laboratorio agrícola Agrodiagnostic, ubicado en la Av. Interoceánica s/n y Fernández Salvador esquina, Sector Pifo.

La colaboradora MSc. Zayda Morales, docente de la UDLA aportó con sus conocimientos científicos y desempeñó el papel de Directora de proyecto de titulación.

Además el MSc. Wilson Tapia aportó en el análisis estadístico de los datos obtenidos.

2.2 Fase de campo

2.2.1 Área de muestreo

La toma de muestras se realizó en campos cultivados con brócoli en la Hacienda Santa Isabel ubicada en la Provincia de Cotopaxi.

2.2.2 Recolección de suelos

Las muestras recolectadas se tomaron de cuatro campos de brócoli con diferentes estados de crecimiento tal como se indica en la tabla 1. Todos los lotes muestreados tenían una sola variedad comercial.

Para la recolección de las muestras se realizó un muestreo aleatorio simple, el cual consistió en dividir el terreno en partes iguales asignando un número distinto en cada unidad. Se utilizó una tabla numérica aleatoria llamada tabla Random para garantizar que las muestras se tomen verdaderamente al azar (Anexo 1).

Debido a que los terrenos eran irregulares se estandarizó un área de 50 m de ancho y 150 m largo para poder generar puntos de muestreo. Se tomaron 20 submuestras de toda el área de cada terreno con una profundidad de 30 cm, entre dos plantas de brócoli, las cuales se homogenizaron hasta tener 4 muestras compuestas de cada terreno de aproximadamente 1 Kg (Anexo 2, 3) (Fertilab, 2013).

Tabla 1. Descripción de la historia del campo, coordenadas geográficas, zonas de muestreo y la edad del cultivo.

Código del campo	Fecha de muestreo	Cantón/Parroquia/ Localidad	Coordenadas GPS	Altitud	Edad de cultivo	Variedad del brócoli	Cultivo anterior	Observaciones del manejo del suelo
San Cristóbal I	Cotopaxi/ 2015-09-14	Latacunga / Poaló/ Hacienda Santa Isabel	O78°39'24.87'' S0°52'2.43''	2907m	89 Días	Brócoli Avenger	Papa Potrero	Preparación del suelo mecánico, Fertilizante aplicado es una mezcla de N. P. K. Ca. Mg. S 130-80-250-20-10-10Kg Respectivamente el B. Fe. Zn. Mg de manera foliar y fosfitos. Pesticidas (Insecticidas) Clorpirifós, Cañón, Cipermetrina, Dimetoato, Ingeo, (Fungicidas) Metalic, Revuz, Lancharo, Comet, Sico, Cantus folio gold. Utilización de Biol
San Cristóbal II	Cotopaxi/ 2015-09-14	Latacunga / Poaló/ Hacienda Santa Isabel	O78°39'22.64'' S0°52'4.18''	2906m	39 Días	Brócoli Avenger	Papa Potrero	
San Cristóbal III	Cotopaxi/ 2015-09-14	Latacunga / Poaló/ Hacienda Santa Isabel	O78°39'22.8'' S0°52'6.13''	2906m	80 Días	Brócoli Avenger	Potrero Pasto	
Era Vieja I	Cotopaxi/ 2015-09-14	Latacunga / Poaló/ Hacienda Santa Isabel	O78°39'20.25'' S0°52'16.18''	2907m	35 Días	Brócoli Avenger	Kikuyo	

Las 4 muestras compuestas de suelo se sometieron a un análisis físico-químico. Además se midió la temperatura ambiental, la temperatura del suelo, las coordenadas GPS y la humedad de cada punto de muestreo (Anexo 4, 5). En la tabla 2 se muestran los parámetros que se analizaron en este proyecto de investigación.

Tabla 2. Parámetros analizados en el estudio del aislamiento de bacterias bioacumuladoras de boro, en suelos cultivados con brócoli en la provincia de Cotopaxi.

Parámetros de estudio	Descripción	Factor a evaluar
Humedad	Contenido de agua en el suelo, definido como el coeficiente entre el volumen de agua presente en un volumen total de muestra de suelo	Porcentaje de agua contenida en el suelo.
Temperatura	Temperatura del suelo en cada zona de muestreo.	Temperatura °C
pH	Coeficiente de acidez o basicidad	pH
Materia orgánica del suelo	Materia orgánica (CHON) presente en el suelo de cada zona de muestreo.	Materia orgánica de suelo en la zona de muestreo.
Composición química del suelo	Cuantificación de; Cu, P, K, Al, Fe, S, Na B, Ca, Mn Zn N, Mg, Ca presentes en el suelo.	Contenido de cada elemento (ppm o meq/mL) de suelo de cada terreno
Tolerancia a altas concentraciones de boro	Medios suplementados con diferentes concentraciones de boro.	Crecimiento bacteriano
Biodiversidad microbiana	Las poblaciones bacterianas depende del campo muestreado.	Géneros bacterianos
Bacterias bioacumuladoras de boro	Bioacumulación intracelular y residual (medio) de boro.	Concentración de boro inicial y final del medio en ppm.

2.3 Fase de laboratorio

2.3.1 Medición del porcentaje de humedad de las muestras de suelo (Norma AASHTO T-93)

Para obtener el porcentaje de humedad se realizó el método de secado al horno, donde se colocó 100 gramos de suelo en un recipiente previamente pesado, en la estufa a 105° C por 24 horas (Álvarez, 2011; Moreno y Rodríguez 2013). Trascurrido ese tiempo se pesó el recipiente con la muestra seca.

$$W = \left(\frac{W_w}{W_s} \right) * 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Dónde:

W: Porcentaje de humedad

Ww: Peso de la muestra húmeda más el recipiente – peso de la muestra seca más el recipiente

Ws: Peso de la muestra seca más recipiente – peso del recipiente

2.3.2 Aislamiento de bacterias acumuladoras de boro

Los suelos muestreados de los diferentes campos fueron transportados en bolsas de plástico con su respectiva etiqueta.

Para el procesamiento de las muestras se hizo una modificación del método sugerido por Aquiahuat, Volke, Prado, Shirai y Salazar (2012). Se pesó 1 g de cada muestra y se colocó en 9 mL de solución salina al 0.85 % (p/v) en un matraz estéril, posteriormente se agitó y se esperó 10 minutos. Seguidamente se realizaron diluciones seriadas de 10E-1 a 10E-4 en tubos con 9mL de solución salina a 0,85% (p/v). Las diluciones fueron sembradas por el método de superficie en el medio Luria Bertani con boro por triplicado (Anexo 6). Se tomó 0,1 mL de cada disolución y se colocó en la superficie del medio de

cultivo LB con 4 ppm de boro para su posterior crecimiento por triplicado, la muestra se extendió con el asa de Drigalsky en toda la superficie de la placa en condiciones estériles. Tal como se muestra en la figura 6.

Como señala Aquiahuat et al. (2012). Las placas se incubaron durante 48 h a 30°C. Después del tiempo de incubación se realizó el conteo directo de las colonias en placa.



A partir de las colonias obtenidas, se seleccionaron cepas por cada campo en base a su morfología.

2.3.3 Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco

Se hizo el conteo únicamente de las cajas que se pueda ver de 30 a 300 colonias, para reportar las unidades formadoras de colonias (UFC/g s.s.) se realizó la siguiente ecuación (Fernández et al., 2006):

$$\text{UFC/g s. s.} = (\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/\text{V}) / (\text{P} * \text{FH}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dónde:

UFC/ g s.s.: Unidades formadoras de colonias / g de suelo seco.

NC: Número de colonias en una caja.

FD: Factor de dilución correspondiente a la caja.

V: Volumen inoculado en la caja

P: Peso de la muestra húmeda.

FH: Factor de humedad (1-(% humedad/100)).

2.3.4 Identificación de las bacterias seleccionadas

2.3.4.1 Identificación macroscópica

Se realizó tinción Gram y KOH al 3 % a las cuarenta colonias aisladas, también se describió la morfología de cada colonia siguiendo los criterios que se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Criterios para la descripción morfología de las cepas bacterianas.

Criterio de Evaluación	Descripción
Pigmentación	Blanco, gris ,mate, amarilla anaranjada, rosada, roja , café (o el color que tome la colonia)
Tamaño	Pequeña o grande
Superficie de la colonia	Plana, acumulada, planoconvexa, umbilicada, convexa, papilada
Forma	Puntiforme, irregular, circular, rizoide, filamentosa, fusiforme.
Borde	Redondeado, espiculado, ondulado, filamentoso, lobulado, rizoide.
Consistencia	Cremosa, Grasienta
Característica óptica	Opaca, translúcida
Estructura interna	Suave, lisa , rugosa

Adaptado de: Prescott, Harley y Klein, 2004.

2.3.4.2 Identificación microscópica

Se realizó tinción Gram para observar si la bacteria es Gram positiva o Gram negativa, su forma y agrupación (Aquiahuat et al., 2012; Pírez y Mota, 2008).

2.3.5 Determinación de la tolerancia a altas concentraciones de boro

Para determinar la tolerancia a concentraciones altas de boro, las cepas bacterianas puras previamente aisladas se sometieron a concentraciones de 10 – 1.500 ppm de boro (Ahmed et al., 2007a, b, c ; Raja et al., 2012a; Miwa et al., 2008) en el medio LB.

2.3.6 Estimación de la bioacumulación de boro

Tomando en consideración que los suelos analizados en el presente proyecto tienen aproximadamente una concentración de 4 ppm de boro, se decidió tomar como referencia esta concentración para los experimentos de bioacumulación. Pensando en la utilización de estas bacterias para procesos de bioacumulación para la remediación de estos suelos brocoleros a futuro.

Se realizó una modificación en metodología usada por (Raja et al., 2012a) para determinar la bioacumulación de boro.

Se colocó 50 mL de medio LB en cinco matraces de suplementados con 4 ppm de boro, posteriormente se realizó una incubación con una concentración de bacteria de 10^8 UFC/ mL (Alström, 1991; Esringü, Turan, Güneş y Karaman, 2014). Los recipientes se incubaron a 30 °C en agitación por siete días como se observa la figura 7. Se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 10 minutos, finalmente se extrajo 10 mL del sobrenadante para analizar la concentración de boro residual por el método de la curcumina (Miwa et al., 2008; Verce, Stiles, Chong y Terry, 2012).



Figura. 7 Medios inoculados con cinco cepas bacterianas después de siete días en agitación a 30 °C.

Para obtener la concentración de células ($10E8$), se hizo un conteo en la cámara de Neubauer utilizando la metodología de Bastidas (2010) ecuación 1.

$$\text{Concentración de células} = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} * 4 \times 10^6 \quad (\text{Ecuación 3})$$

2.3.6.1 Método de la curcumina

Se utilizó el método colorimétrico de la curcumina para detectar la concentración de boro, este método puede cuantificar desde 0,2 μg en adelante. La curcumina se une al boro en un medio ácido y forman un complejo rojo llamado rosocianina que es medido fotométricamente (COVENIN, 1987; Pino y Pérez, 1983). Los análisis para determinar la concentración de boro se realizaron en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Santa Catalina por el método de la curcumina modificado de Alvarado et al. (2009).

2.3.7 Identificación bioquímica de las cepas escogidas

A las cinco bacterias aisladas con las mejores características de tolerancia y bioacumulación se les realizó una identificación bioquímica con tres sistemas miniaturizados; API® BioMérieux, Microgen™ GnA+B-ID, Microgen® Bacillus-ID utilizando los manuales del comerciante.

Para las bacterias Gram positivas se utilizó las pruebas API ® 50CHB/E y Microgen® Bacillus-ID; para las Gram negativas el sistema Microgen GN-ID como se observa en la figura 8. Se siguieron las instrucciones mencionadas por el fabricante de cada producto. Además de eso se realizaron pruebas de oxidasa, catalasa y motilidad.

Las pruebas API 50CHB/E se dividen en dos; la primera es API 20E que contienen una serie de pruebas bioquímicas como: Voges–Proskauer, ONPG, arginina dehidrolasa, lisina y ornitina descarboxilasa, utilización de citrato, producción de sulfuro de hidrógeno, ureasa, TDA, producción de indol, producción de acetoina, hidrólisis de gelatina y fermentación/ oxidación de glucosa y manitol. La segunda prueba API 50 CHB (Fermentación de carbohidratos y derivados) contiene diferentes sustratos como glicerol, eritrirol, D-arabidosa, ribosa, glucosa, manosa, celobiosa, L-sorbosa, xilpiranosido, dulcitol, inositol, D-galactosa, maltosa, lactosa, melibiosa, trehalosa, xilosa, manitol, fructuosa, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, amigdalina, arbutina, sorbitol, D-adonitol, metil-BD-xilpiranosido, metil- α D-manopiranosido, metil- α D-glucopiranosido, N-acetilglucosamida.

Las pruebas Microgen™ GnA+B-ID contienen: lisina y ornitina descarboxilasa, producción de sulfuro, fermentación de glucosa, manitol y xilosa, ONPG, producción de indol, ureasa, utilización de citrato, reducción de nitrato, gelatina, malonato, fermentación de inositol, sorbitol, ramnosa, sucrosa, lactosa, arabinosa, adonitol, rafinosa, salicina.

Las pruebas Microgen™ Bacillus-ID contienen sustratos de : arabinosa, celobiosa, inositol, manitol, manosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sorbitol, sucrosa, trehalosa, xilosa, adonitol, galactosa, metil-D-manosido, metil-D-glucósido, inulina, melecitosa, indol, ONPG, nitrato, arginina dehidrolasa, citrato, Voges–Proskauer.

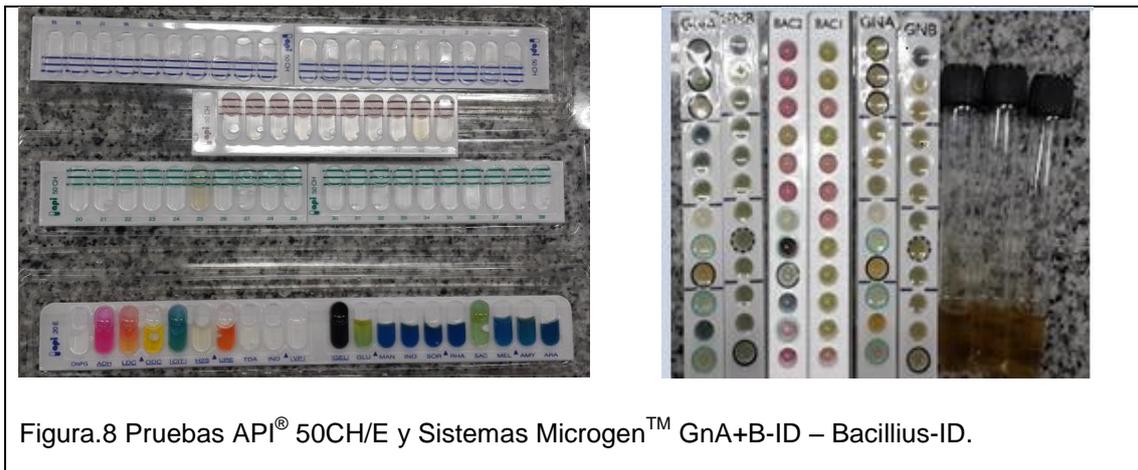


Figura.8 Pruebas API® 50CH/E y Sistemas Microgen™ GnA+B-ID – Bacillus-ID.

2.4 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se procesaron de manera descriptiva para encontrar la media, la tendencia central y la dispersión.

Para la comparación de las muestras se realizó la prueba paramétrica ANOVA junto con el método de Tukey para contrastar las medias de cada tratamiento. En el análisis de tolerancia y bioacumulación de boro se utilizó un análisis estadístico descriptivo. Además se emplearon tablas, ecuaciones y figuras con la ayuda de programas estadísticos como Microsoft Office Excel® y SPSS®.

3. CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Análisis físico químico de los suelos

Se realizó un análisis físico químico a las muestras compuestas de los cuatro campos, donde el suelo de la hacienda Santa Isabel presentó una clase textural franco arenoso.

Tabla 4. Parámetros tomados en los cuatro campos.

Campo	Temperatura ambiente (°C)	Media de la temperatura por punto de muestreo (°C)	Humedad relativa (VWC%)
San Cristóbal I	13	11,25	23,00%
San Cristóbal II	13	15,5	15,07%
San Cristóbal III	14	10,9	16,41%
Era Vieja I	14	16	17,18%

La tabla 4 indica que la temperatura por cada punto de muestreo varió entre 10,9 °C – 15,5 °C y la humedad de los campos muestreados en la provincia de Cotopaxi fue entre 15,07% - 23,00 %. El pH varió entre 7,9 – 8,2 demostrando ser suelos ligeramente alcalinos.

Tabla 5. Resultado del análisis físico-químico de los cuatro campos cultivados con brócoli de Cotopaxi-Ecuador.

Campo	Clase Textural	pH	CE (mmhos/cm)	CICE (meq/100mL)	MO (%)	NH ₄ ppm	P ppm	NH ₃ ppm	K (meq/100mL)	Ca (meq/100mL)	Mg (meq/100mL)	Na (meq/100mL)	Cu ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm	B ppm	SO ₄ ppm
San Cristóbal I	Franco Arenoso	7,90 LAI	1,67 S	12,15 M	1,8 B	66,8 M	66,0 A	72,20 M	0,51 A	8,13 A	3,06 A	0,45 S	3,90 S	69,8 A	4,80 B	6,50 S	3,98 A	37,5 S
San Cristóbal II	Franco Arenoso	7,90 LAI	2,65 A	18,10 M	2,18 M	51,90 M	124,6 E	112,60 S	1,08 A	12,17 E	4,30 A	0,55 S	4,20 A	96,0 E	6,90 M	7,80 A	5,08 E	63,5 E
San Cristobal III	Franco Arenoso - Arena Franca	8,20 AI	1,80 S	17,56 M	1,94 B	61,40 A	120,4 E	36,90 B	0,89 A	11,88 E	4,24 A	0,55 S	4,10 A	77,9 E	6,90 M	7,80 A	4,50 E	55,1 A
Era Vieja I	Franco Arenoso	8,10 AI	2,16 A	20,86 A	2,47 M	62,80 A	110,8 E	76,00 M	0,86 A	14,68 E	4,77 A	0,55 S	4,40 A	69,6 A	7,40 M	8,10 A	5,85 E	57,8 A

Nota: Los símbolos de B, M, S, A, E: Bajo, Medio, Suficiente, Alto, Exceso respectivamente; LAI, AI: Ligeramente alcalino y Alcalino estos valores tienen como significado clasificar los valores de los parámetros analizados con un nivel de confianza del 95%. AGROBIOLAB 2015.

La tabla 5 nos presenta el resultado del análisis físico químico, donde se puede observar que en todos los campos muestreados la concentración del boro se encuentra en exceso, la cantidad de los otros elementos inorgánicos importantes como Calcio (Ca), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Potasio (K), Cobre (Cu), Fósforo (P) y Magnesio (Mg), tienen niveles entre altos y en exceso. El sodio (Na) tiene un nivel suficiente en cada campo.

3.2 Aislamiento de colonias a partir de suelos cultivados con brócoli

Las muestras de suelo fueron procesadas por el método de dilución en serie y colocadas en medio LB con una concentración de 4 ppm de boro.

El análisis de varianza (ANOVA), compara los resultados obtenidos de los tratamientos y contrasta la hipótesis nula con la alternativa. La hipótesis nula señala que las medias de N poblaciones son iguales, mientras la hipótesis alternativa indica que al menos una de las N poblaciones son diferentes. Se rechaza o se acepta la hipótesis según los valores obtenidos.

Prueba general:

$$H_0 = \mu_i = \mu_j$$

$$H_A = \mu_i \neq \mu_j \quad i \neq j$$

Tabla 6. Análisis de varianza de las UFC/g.s.s de los cuatro campos brocoleros muestreados.

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	P/Valor	Valor crítico para F
Tratamiento	2,028E9	3			
Error	7,810E8	8	6,925	0,013	4,066
Total	2,809E9	11			

Nota: Nivel de significancia de 0,05

Para saber si existe diferencias significativas se realizó la prueba estadística ANOVA. En la tabla 6, se evidencia que el valor de F (6,925) es mayor que el valor crítico de F (4,066) y el valor P de significancia (0,013) es menor a 0,05.

Donde, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa existiendo diferencias en la cantidad de UFC/g s.s. en los cuatro campos muestreados.

Adicionalmente, para identificar si los grupos son diferentes entre sí, se realizó la prueba de Tukey, una prueba de significancia que efectúa comparaciones entre las medias utilizando un rango estandarizado de distribución.

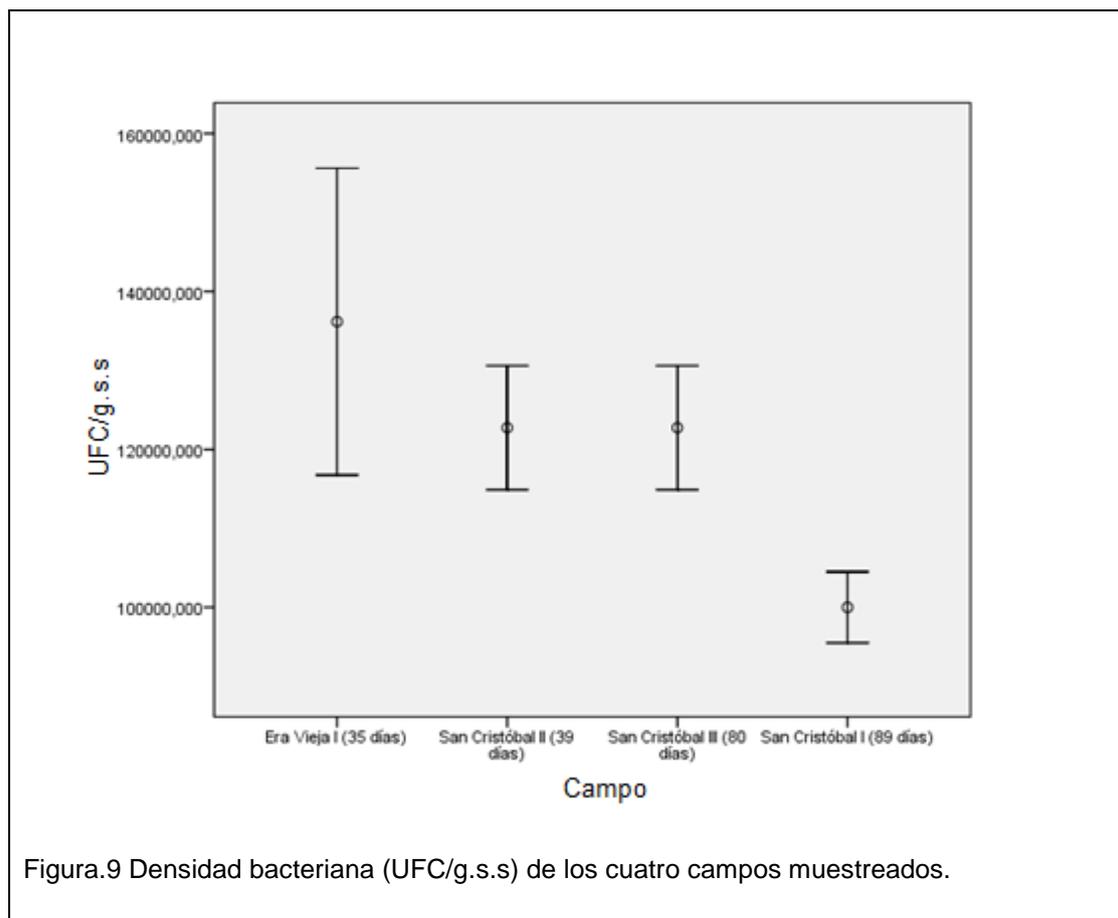
Tabla 7. Comparación de medias mediante la prueba de Tukey.

Campo	N	Valor alfa=0,05	
		A	B
San Cristóbal I	3	1,00E5	
San Cristóbal II	3	1,23E5	1,23E5
San Cristóbal III	3	1,23E5	1,23E5
Era Vieja I			1,36E5
Sig.		0,086	0,399

Nota: La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Se puede identificar en la tabla 7 que las unidades formadoras de colonias UFC/ g s.s. del campo Era vieja I de 35 días de edad difiere del campo San Cristóbal I de 89 días de edad.

Las barras de error en la figura 9 representan la variabilidad de la densidad bacteriana que existe entre los diferentes campos muestreados. Como se demostró en la prueba de Tukey anteriormente existen dos grupos; el primero está conformado por los campos San Cristóbal II (1,26E5) y San Cristóbal I (1,23E5) con una concentración similar de unidades formadoras de colonias (UFC/ g s.s.), las cuales se encuentran contenidas dentro del campo Era vieja I con una concentración mayor de UFC/ g s.s. (1,36E5). Mientras que el segundo grupo conformado por el campo San Cristóbal I difiere de los demás con una concentración menor de UFC /g s.s. (1,00E5).



Se aislaron un total de cuarenta cepas bacterianas como se visualiza en la figura 10. Se obtuvo en total veintiséis cepas Gram positivas y catorce Gram negativas cada una con diferentes características morfológicas, bacilos (31), cocos (4), y actinomicetos (5) como se muestra en el Anexo 8.



3.3 Determinación de la tolerancia a altas concentraciones de boro

Se realizó medios con agar LB a diferentes concentraciones de boro empezando con 4 ppm (boro encontrado en el suelo muestreado) hasta 750 ppm, para saber si la bacteria toleraba altas concentraciones de este metaloide se observó el crecimiento semanalmente en cada experimento.

Las bacterias con los códigos de aislamiento BorA16, BorB27, BorB29, BorC310 y BorD46 crecieron normalmente a 750 ppm de boro en placa después de 72 horas de incubación. Tal como se puede observar en la figura 11.

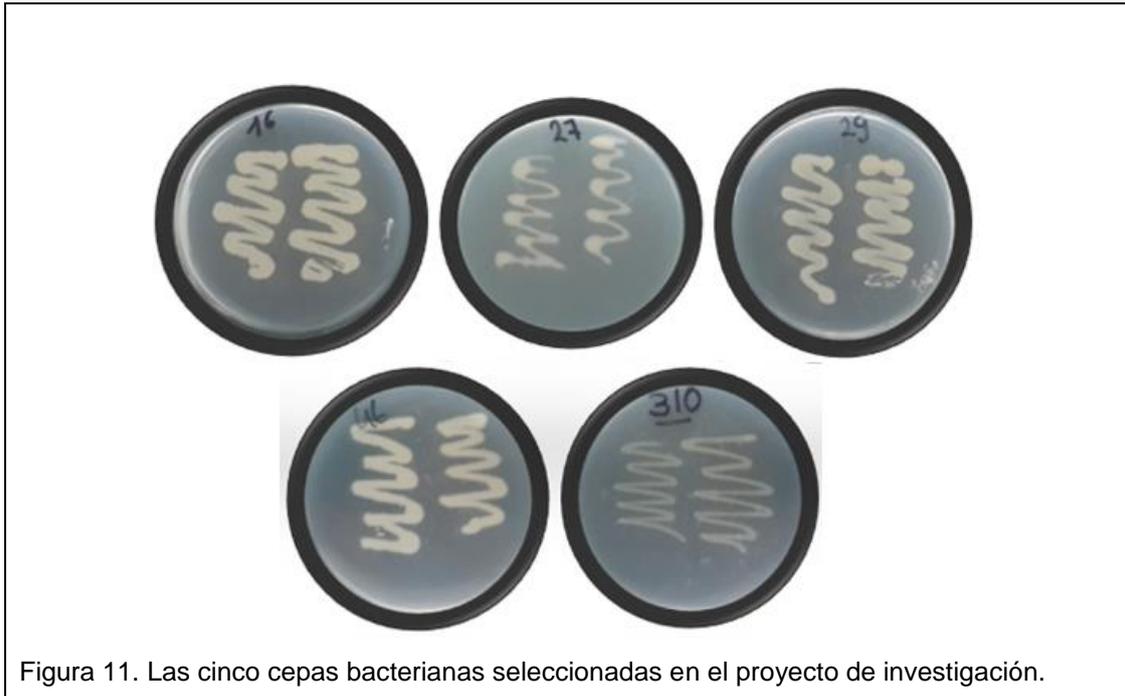


Figura 11. Las cinco cepas bacterianas seleccionadas en el proyecto de investigación.

En la tabla 8, se observa un resumen de las concentraciones utilizadas con el parámetro de presencia de crecimiento bacteriano, inicialmente las cuarenta colonias crecieron a 4 y 8 ppm de boro.

Las concentraciones se duplicaban cada semana sin la presencia de cambios significativos en el crecimiento de las cepas bacterianas, por esta razón se optó subir 100 ppm más a la cantidad inicial por experimento.

Las cepas fueron colocadas en concentraciones de hasta 1.500 ppm de boro (no descritos en la tabla), dando como resultado un crecimiento negativo. Por esta razón se decidió escoger cinco cepas puras que se desarrollaron a una concentración de 750 ppm de boro.

Tabla 8. Evaluación de la tolerancia bacteriana a diferentes concentraciones de boro.

Concentraciones (ppm de boro)	Presencia de crecimiento bacteriano
4	40
8	40
12	32
24	32
50	30
100	29
500	15
750	5

3.4 Evaluación de la bioacumulación de boro de las cepas aisladas de suelos cultivados con brócoli

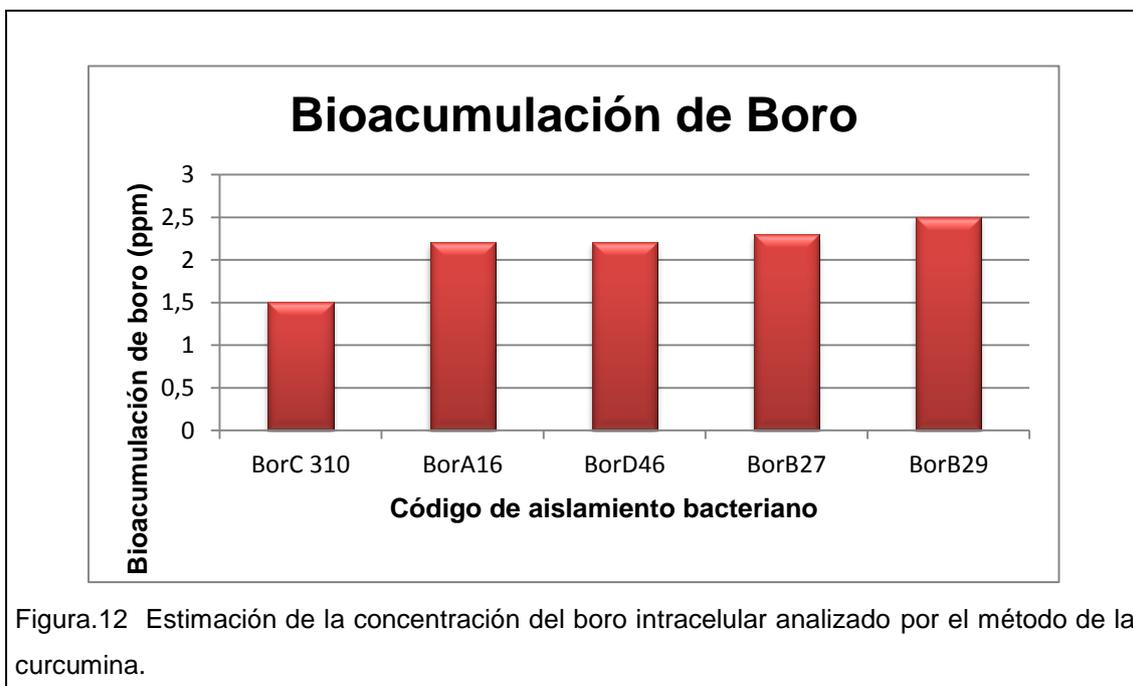
Las cinco cepas aisladas se colocaron a una concentración de 4 ppm de boro en 50 mL de caldo LB, después de siete días de incubación con agitación se cuantificó dicho elemento presente en el medio. Este procedimiento fue realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (Anexo 7).

Se hizo una diferencia entre los datos del boro inicial colocado en el medio y los datos del boro residual (Verce et al., 2012), de esta manera se adquirió los datos de la concentración intracelular de dicho elemento en las bacterias como se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Cuantificación del boro residual e intracelular de las cinco cepas bacterianas aisladas.

Código de aislamiento	Boro residual (ppm)	Boro intracelular (ppm)
BorA16	1,8	2,2
BorB27	1,7	2,3
BorB29	1,5	2,5
BorD46	1,8	2,2
BorC310	2,5	1,5

Se realizó un análisis descriptivo de la figura 12, donde se identificó que las cepas con mayor actividad de bioacumulación son BorB29, BorB27 con un porcentaje de 62,5% y 57,5% respectivamente, mientras que la bacteria BorC310 tuvo una menor actividad con tan solo 37,5 %.



3.5 Caracterización de las cepas obtenidas a través de pruebas bioquímicas

Una vez que se obtienen las cepas con las mejores características de tolerancia y bioacumulación se procedió a realizar las pruebas bioquímicas de las marcas API® BioMérieux, Microgen™ GnA+B-ID y Microgen® Bacillus-ID siguiendo las consideraciones de los fabricantes.

Los resultados de la identificación de las cinco bacterias se encuentran en la tabla 10 con su respectivo código de identificación obtenido de las pruebas bioquímicas, la morfología, la tinción Gram, pruebas de catalasa y oxidasa y el posible género bacteriano de las cepas seleccionadas.

Tabla 10. Identificación de las bacterias con mayor tolerancia y bioacumulación de boro.

Código de aislamiento	Código de identificación bioquímica	Morfología bacteriana	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa	Posible género bacteriano
BorA16	00230124 Microgen® Bacillus-ID	Bacilo esporulado	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Bacillus</i> spp.
BorB27	00014525 Microgen® Bacillus-ID	Bacilo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Bacillus</i> spp.
BorB29	0522000000 050130012 API® BioMérieux,	Bacilo esporulado	Positivo	Positivo	Negativo	<i>Brevibacterium</i> spp.
BorC310	440020001 Microgen™ GnA+B-ID	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	<i>Pseudomonas</i> spp.
BorD46	00260024 Microgen® Bacillus-ID	Bacilo esporulado	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Bacillus</i> spp.

4. CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

4.1 Análisis físico químico de los suelos

Los cuatro campos muestreados presentaban la misma preparación de suelos; abonos orgánicos, rotación de cultivo, pesticidas, fertilizantes y fungicidas. La diferencia radicó en el estado de crecimiento del cultivo.

El análisis físico químico de los cuatro suelos mostró que existen varios micronutrientes y macronutrientes en cantidades altas y en exceso, como es el caso del Mg, K, P, Ca, B, Fe y Zn. Estas cantidades altas pueden provocar un bloqueo y déficit de otros nutrientes, bajas concentraciones de materia orgánica y la reducción de la funcionalidad normal del suelo lo cual está confirmado por Barbazán y Suelos (1998).

Las cantidades de boro encontradas en los campos muestreados pueden deberse a la utilización de fertilizantes comerciales que usan dicho micronutriente, solo o en complejos con otros elementos como Fe, Zn y Mg de manera foliar para el normal desarrollo de los cultivos de brócoli como lo describe Acuña y Molina (2007).

Las concentraciones de boro encontradas en el análisis físico químico realizado a los cuatro campos, nos arroja valores en exceso con un rango de 3,98 ppm a 5,58 ppm. Estos datos se relacionan con el estudio elaborado por Batabyal et al. (2015), que afirma que este elemento está en exceso cuando pasa el límite de 1,0 ppm en suelos cultivados con brócoli. Este exceso se asocia con el fósforo, debido a que este es utilizado para el desarrollo normal de los cultivos. La concentración óptima de P es de 46,45 ppm, cuando éste excede dicha concentración como es el caso de los suelos muestreados en esta investigación (66 a 124 ppm), tienden a aumentar las posibilidades de una acumulación de boro en suelos y raíces de los cultivos agrícolas según afirma Chatterjee, Sinha y Agarwala (1989). También en el estudio se encontró que el

calcio se encuentra en exceso, lo cual es lógico debido a que este se formula en conjunto con el boro para ayudar al cultivo a solubilizar este último impidiendo su acumulación en el suelo como lo menciona Kabata-Pendias et al. (2011)

4.2 Aislamiento de colonias a partir de suelos cultivados con brócoli

En este estudio se identificó que la mayor cantidad de materia orgánica se observa en los campos Era vieja I y San Cristóbal II probablemente debido a la aplicación reciente de abonos orgánicos y biofertilizantes. Los cuales ayudan a mejorar la condición física química del suelo, son fuente de vida bacteriana, mantienen la humedad e incrementan la absorción del agua permitiendo un buen desarrollo de los cultivos tal como se contrasta con el estudio realizado por Senesi (1989). Además, estos campos presentaron mayor temperatura, a diferencia de los demás, parámetro relacionado con el aumento de la densidad bacteriana, como se puede contrastar con el número de UFC/g.s.s. como lo menciona Rucks et al. (2004).

4.3 Determinación de la tolerancia a altas concentraciones de boro

Las cinco cepas bacterianas estudiadas tuvieron la capacidad de tolerar concentraciones de hasta 750 ppm a diferencia de otros estudios realizados que alcanzaron hasta aproximadamente 5.000 ppm de boro (Ahmed et al., 2007d; Ahmed et al., 2007b; Miwa et al., 2009), esto probablemente está asociado a que las bacterias aisladas en estos estudios provenían de diferentes campos mineros y de experimentación altamente contaminados con este metaloide. Sin embargo los resultados obtenidos en este estudio son relevantes debido a que el suelo muestreado tenía aproximadamente 4ppm de boro.

En este estudio se encontró cuatro bacterias Gram positivas y una Gram negativa resultados que se comparan con anteriores trabajos relacionados, donde se ha visto una amplia diversidad bacteriana, que toleran altas concentraciones de boro como especies pertenecientes al grupo de las Gram positivas *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Lysinibacillus boronitolerans*, *Bacillus boroniphilus* sp. *Gracilibacillus boraciitolerans* sp.nov. capaces de tolerar 540, 1.622, 3.243 y 4.864 ppm de boro respectivamente (Ahmed et al., 2007a,b,d) y bacterias Gram negativas *Chimaericella boritolerans* sp. nov. y *Variovorax boronicumulans* sp. nov. (Ahmed et al., 2007c; Miwa et al., 2008).

4.4 Evaluación de la bioacumulación de boro y caracterización a través de pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de suelos cultivados con brócoli

Cinco cepas bacterianas fueron seleccionadas por su capacidad de tolerar y bioacumular boro; los perfiles bioquímicos indicaron que estas bacterias podrían pertenecer a los géneros *Brevibacterium* spp.(1), *Bacillus* spp.(3) y *Pseudomonas* spp. (1). Bioacumularon un total de 2,2; 2,2; 2,3; 2,5 y 1,5 ppm de boro respectivamente. El nivel de bioacumulación es similar al estudio reportado por Raja et al. (2012a), donde se probaron tres cepas aisladas de suelos mineros de un 99% de homología con *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus cereus* (1), *Bacillus cereus* (2) y *Bacillus pumilus*, capaces de acumular de manera eficiente, rangos de 0,1 a 2,3 ppm y 1,5 a 4,7 ppm de boro en 24 y 168 horas respectivamente. Otra investigación realizada por el mismo autor señala que se aisló un total de diez cepas del desierto de Mongolia, donde se realizaron pruebas de tolerancia al cloruro de sodio, boro y arsénico. Las cepas tienen un rango de bioacumulación de 0,3 a 2,6 ppm de boro, donde la mejor cepa perteneció al género *Bacillus* con una similitud del 99% a *Bacillus safensis* FO-036b (Raja et al, 2012b).

Desafortunadamente, no se conoce específicamente el lugar donde las bacterias del presente estudio bioacumulan las concentraciones de boro, pero se podría inferir que estas pueden estar utilizando tres mecanismos como la

bioacumulación en la superficie, a nivel extracelular o intracelular (Cañizares, 2000).

En la superficie bacteriana, específicamente en la pared celular el metal interacciona con los grupos aniónicos (carboxilo, fosforo, sulfatos, entre otros), este proceso va a depender de la especie bacteriana. Sleytr, Györvary y Pum, (2003) describen que los *Bacillus* spp. y otras cepas bacterianas están cubiertas por una superficie proteica llamada capa S. Esta es capaz de unirse a altas concentraciones de Uranio y otros iones metálicos (Paladio, Platino, Oro), es una capa superficial constituida por gliocoproteínas o proteínas, que se autoensamblan en toda la superficie de la bacteria, nominada como un interfaz entre la célula y el medio ambiente y de esta manera podría llegar al citoplasma y tal vez incorporarse a las proteínas.

Se ha visto que algunas bacterias también acumulan metales a nivel extracelular, este mecanismo podría producir diferentes procesos como la movilización e inmovilización del boro, la síntesis de sideróforos y polímeros extracelulares (Chen et al., 1995; Lindsay y Riley, 1994).

Otro mecanismo importante y el cual podría estar relacionado con las bacterias de este estudio, son las interacciones intracelulares o procesos de bioacumulación. Este proceso es lento y requiere de energía, por esta razón solo se da en bacterias vivas, es capaz de atrapar mayor cantidad de iones metálicos a diferencia de los demás mecanismos. Pueden existir transformaciones enzimáticas y síntesis de proteínas enlazadoras a los metales denominadas metaloproteínas. Estas proteínas enlazan los metales al interior celular, debido a su alta afinidad que tienen hacia los iones metálicos (Churchill, Walters y Churchill, 1995; Brady y Duncan, 1994, Kassin, 1993).

Género *Brevibacterium* spp.

Como se mencionó anteriormente, las cepas con resultados más favorables en el análisis de bioacumulación podrían pertenecer al género *Brevibacterium*

spp., pues demostraron ser más eficientes en la reducción de la concentración de boro, según el análisis colorimétrico de la curcumina. Las bacterias aisladas bioacumularon un total de 62,5 % de boro *in vitro*, esto podría deberse a que el género se caracteriza por la capacidad de resistir, acumular y eliminar altas concentraciones de varios metales nocivos como plomo, cobre, cadmio etc. (Vecchio, Finoli, Di Simine y Andreoni, 1998)

Estudios realizados por Rehman, Muneer, y Shakoori (2007) aseguran que algunas especies de este género tienen alta capacidad de captación de iones metálicos y no metálicos. La *Brevibacterium casei* es una de ellas, debido a que puede remover hasta un 70% de mercurio después de 24 horas de exposición *in vitro*, utilizando procesos de bioacumulación intracelular o mecanismos de biosorción como: la desintoxicación enzimática del mercurio orgánico a inorgánico y la adsorción de los iones metálicos en la superficie celular. Este género también se caracteriza por la capacidad de tolerar 100, 500 y 1.000 ppm de cromo con una eficiencia del 41%, 14% y 9% de remoción respectivamente, tal como lo menciona Faisal y Hasnain (2004). Las bacterias pertenecientes al género *Brevibacterium* sp. también se les conoce como zinc-resistentes debido a su capacidad de tolerar altas concentraciones de Zn y remover hasta un 80% *in vitro* (Taniguchi et al., 2000).

No se ha registrado reportes del género *Brevibacterium* spp. relacionados en procesos de bioacumulación de boro.

Género *Bacillus* spp.

Observando los resultados obtenidos de la morfología, tinción Gram y de las pruebas bioquímicas los *Bacillus* determinados en este estudio se asocian a *B. cerus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. firmus* que comúnmente se encuentran habitando el suelo como lo menciona Calvo y Zúñiga (2010); McSpadden (2004).

En esta investigación, los *Bacillus* spp. demostraron ser los segundos mejores bioacumuladores de boro, estudios registran la alta capacidad que tiene este género, en adsorber metales pesados como el plomo, cadmio, cobre, níquel, manganeso, cromo, zinc, boro, cobalto y otras soluciones mixtas de metales en condiciones de laboratorio (Kim et al., 2007). Existen varias especies pertenecientes al género *Bacillus* spp. involucrados en mecanismos de tolerancia y bioacumulación de boro, como es el caso de cepas que podrían ser *Bacillus cereus* (1), *Bacillus cereus* (2), *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus boroniphilus* mencionados anteriormente (Ahmed et al., 2007a; Miwa et al., Raja et al., 2012a,b;). Velásquez y Dussan (2009) señalan que especies del *Bacillus* spp. pueden realizar procesos de biosorción y bioacumulación, ya sea en biomasa viva o muerta; la adsorción se da por medio de las moléculas de superficie (capa S) y la acumulación se da a través de proteínas (metaloproteínas), que la célula usa normalmente para incorporar elementos esenciales, tales como el fósforo y el azufre.

La biomasa viva o muerta de este género puede ser usada como un bioadsorbente, con alta remoción de metales pesados en suelos o en soluciones acuosas con una eficiencia del 90%, los cuales son distribuidos tanto en la pared celular o en la membrana. Por lo tanto es una aplicación biotecnológica útil el uso de *Bacillus* spp en la biorremediación a corto y largo plazo como lo menciona García et al. (2016).

Género *Pseudomonas* spp.

Las cepas bacterianas que podría pertenecer al género *Pseudomonas* spp, también formaron parte del estudio, con un porcentaje de bioacumulación menor que las anteriores 37,5%, este género ha sido muy estudiado en temas de biorremediación de suelos y aguas por su capacidad de biosorción y bioacumulación de metales como cromo, cobre, cadmio, boro entre otros (Hussein et al., 2004; Miwa et al., 2009), sin embargo en este estudio los resultados no fueron favorables para la remoción de boro. Esta investigación

se compara con los datos obtenidos de Miwa et al. (2009), donde señala que las cepas menos favorables a la bioacumulación de boro fueron las que tenían un 99% de homología al género *Pseudomonas* con un total de bioacumulación de tan solo 0,00648 ppm de boro intracelular.

Este género es importante dentro del área de la biotecnología, debido a que las aplicaciones son muy variadas en la industria como; la biodegradación de tóxicos, las biotransformaciones mediadas por enzimas, la producción de metabolitos, la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con petróleo. Teitzel y Parsek, (2003) menciona que existen bacterias de este y otros géneros que han desarrollado una variedad de mecanismos de tolerancia, para contrarrestar el estrés en medios contaminados con metales pesados o residuos petrolíferos, donde incluyen procesos de secuestro, formación de complejos y finalmente la eliminación fuera de la célula.

5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se seleccionaron un total de cinco colonias bacterianas de las cuales dos de ellas presentaron tolerancia y capacidad de bioacumulación, estas cepas se asocian al género *Brevibacterium* spp y *Bacillus* spp.

Se aislaron un total de cuarenta cepas bacterianas, las cuales fueron sometidas a pruebas de tolerancia de hasta 750 ppm de boro, donde únicamente cinco fueron seleccionadas.

Las cinco cepas fueron puestas a prueba en el experimento de bioacumulación, donde las bacterias con el código de aislamiento BorB29, BorB27, BorA16 y BorD46 pertenecientes al grupo de las Gram positivas, bioacumularon un total de 62,5%, 57,5%, 55%, y 55% respectivamente, mientras que la bacteria BorC310 (Gram negativa) con un porcentaje menor de 37,5 %.

Las cinco cepas bacterianas fueron identificadas mediante perfiles bioquímicos enzimáticos, donde BorB29 presentó características de *Brevibacterium* spp., BorB27, BorA16 y BorD46 de *Bacillus* spp. y BorC310 de *Pseudomonas* spp.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar pruebas de bioacumulación con 750 ppm de boro (concentración tolerable por las bacterias).

Se debe continuar el estudio en invernadero, realizando diferentes tratamientos en suelos experimentales contaminados con boro. Tomando en cuenta diferentes parámetros importantes como el pH, la temperatura, la conductividad eléctrica etc.

Utilizar herramientas moleculares, para complementar la identificación del género y de la especie de las cepas bacterianas bioacumuladoras de boro aisladas en este estudio, para obtener datos más fiables y poder compararlos con resultados obtenidos por otros autores.

Si se desea realizar un inoculante bacteriano en un futuro, es necesario realizar pruebas de antagonismo para verificar que no exista competencia entre las cepas y de esta manera escoger cuales de las cinco podrían utilizarse juntas en un producto comercial.

Se recomienda, cuantificar directamente la concentración de boro intracelular de las bacterias (Método de la Azometina-H o Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo) y compararlas con los resultados de este estudio.

REFERENCIAS

- Acuña, A., y Molina, P. (2007). Desempeño funcional del boro en las plantas. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7(1), 1-14, Recuperado el 30 de septiembre del 2015 de <http://www.bioline.org.br/pdf?cg07002>.
- Aguirre, S. (2013). Horticultura. Universidad nacional abierta y a distancia de Bogotá, Colombia. Recuperado el 20 de Octubre del 2016 de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201618/formato_modulos_unad_201618.pdf.
- Agarwal, S.K. (2005), *Advanced environmental biotechnology*. Nueva Delhi: Editorial APH. Recuperado el 15 de Octubre del 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=iSckhBR4FGcC&pg=PA1&lpg=PA1&dq=Advanced+environmental+biotechnology&source=bl&ots=93VILPxnKi&sig=Oe38FNX3xeE8U3fCLknp2vYOink&hl=es>.
- Ahluwalia, S. S., y Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource technology*, 98(12), 2243 - 2257. Recuperado el 20 de Diciembre del 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405005675>
- Ahmed, I., Yokota, A., y Fujiwara, T. (2007a). A novel highly borontolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov., isolated from soil, that requires boron for its growth. *Extremophiles*, 11(2), 217–224. Recuperado el 18 de Noviembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072687>.
- Ahmed, I., Yokota, A., y Fujiwara, T. (2007b). *Gracilibacillus boracitolerans* sp. nov., a highly boron-tolerant and moderately halotolerant bacterium isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(4), 796-802. Recuperado el 05 de Noviembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392209>.
- Ahmed, I., Yokota, A., y Fujiwara, T. (2007c). *Chimaereicella boritolerans* sp. nov., a boron-tolerant and alkaliphilic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from soil. *International journal of systematic*

- and evolutionary microbiology*, 57(5), 986-992. Recuperado el 18 de Octubre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473246>.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., y Fujiwara, T. (2007d). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1117-1125. Recuperado el 20 de Noviembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473269>.
- Alarcón, A. (2001). El boro como nutriente esencial, Horticultura. *Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*. Recuperado el 20 de Octubre del 2015 de <http://www.horticom.com/pd/imagenes/51/155/51155.pdf>.
- Alström, S. (1991). Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 37(6), 495-501. Recuperado el 19 de Diciembre del 2015 de https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/1955/37/6/37_6_495 article.
- Alvarado, S., Córdova, J., López, M., Valverde, F., Moscoso, F., Nicolaide, I., Lucero, J., y Benites, J. (2009). *Metodologías de análisis físico químico de suelos, tejido vegetal y aguas*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Alvarado, A., y Huiracocha, M. (2014). *Impacto en los costos de exportación de brócoli, por la renuncia de Ecuador a la ley de promoción comercial andina y erradicación de drogas (ATPDEA) con los Estados Unidos De América*. (Tesis de maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado el 26 de Octubre del 2015 de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/20589/1/tesis.pdf>

- Álvarez D, B. (2011). *Uso de los Morteros Asfálticos en Vías: Colocación del mortero asfáltico Slurry Seal en la vía La Armenia – Pacto tramo Gualea Cruz – Pacto*. (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. Recuperado el 29 de Octubre del 2015 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/1443>.
- Anderson, G., y Jordan, J. (1961). Boron: a non-essential growth factor for *Azotobacter chroococcum*. *Soil Science*, 92(2), 113-116. Recuperado el 26 de Febrero de http://journals.lww.com/soilsci/Citation/1961/08000/Boron__A_Non_Essential_Growth_Factor_for.7.aspx.
- APROFEL. (2011). *Perspectivas del sector productor procesador y exportador de frutas y vegetales congelados*. Recuperado el 25 de Octubre del 2015 de <http://es.slideshare.net/amchamec/aprofel-amcham>.
- Aquiahuat, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., y Salazar, M. (2012), *Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general*. Universidad Autónoma Metropolitana de México, Ciudad de México D.F. Recuperado el 30 de Noviembre del 2016 de http://www.izt.uam.mx/ceu/publicaciones/MMBG/files/manual_microbiologia_general.pdf.
- Banco Central del Ecuador. (2013), *El brócoli genera 5.000 empleos directos*. Recuperado el 19 de Septiembre del 2015 de <http://biblioteca.bce.ec/cgi-bin/koha/opacdetail.pl?biblionumber=105041>.
- Barbazán, M., y Suelos, A. (1998). Análisis de plantas y síntomas visuales de deficiencia de nutrientes. Facultad de agronomía de la Universidad de la República de Montevideo-Uruguay. Montevideo, Uruguay. Recuperado el 20 de Enero del 2016 de <http://www.fagro.edu.uy/fertilidad/publica/AnPlantas.pdf>.
- Batabyal, k., Sarkar, D., y Mandal, B. (2015). Critical Levels of Boron in Soils for Cauliflower (*Brassica Oleracea* Var. Botrytis). *Journal of Plant Nutrition*, 38(10), 1822-1835. Recuperado el 26 de Noviembre del 2015 de

<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01904167.2015>

1042166.

- Blaser-Grill, J., Knoppik, D., Amberger, A., y Goldbach, H. (1989). Influence of boron on the membrane potential in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* roots and H⁺ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells. *Plant physiology*, 90(1), 280-284. Recuperado el 25 de Noviembre del 2015 de <http://www.plantphysiol.org/content/90/1/280>.
- Brady, D y Duncan, J (1994) Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41(1) 149-154. Recuperado el 06 de Diciembre del 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00166098>.
- Brambila, C. E., y Lozano, P. (1999). Metalotioneinas bioquímica y funciones propuestas. *Boletín de Educación Bioquímica*, 18(1), 21-27. Recuperado el 15 de Noviembre del 2015 de <http://biblat.unam.mx/es/revista/beb-boletin-de-educacionbioquimica/articulo/metalotioneinas-bioquimica-y-funciones-propuestas>.
- Calvo, P., y Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39. Recuperado el 17 de Febrero del 2015 de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162010000100004&script=sci_arttext.
- Camacho, J., Rexach, J., y González-Fontes, A. (2008). Boron in Plants: Deficiency and Toxicity, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (10), 1247–1255. Recuperado el 16 de Octubre del 2015 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7909.2008.00742.x/abstract>.
- Cañizares,R.(2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología-México*, 42(3), 131-143. Recuperado el 26 de Noviembre del 2015 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi003f.pdf>.

- Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Martínez, M., y Caballero, F. (2005). *Bioteología Ambiental*. Madrid, España: Editorial Tébar. Recuperado el 18 de Octubre del 2015 de
- Celeromics. (2010), Formulas de la cámara de Neubauer, Recuperado el 23 de Febrero del 2016 de <http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Neubauer-Chamber-Cell-Concentration.pdf>.
- Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. M.,...y Ruiz, J. M. (2012). Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *Journal of Botany*, 30(2) 1-17. Recuperado el 24 de Enero del 2016 de <https://www.hindawi.com/journals/jb/2012/726206/>.
- Chatterjee, C., Sinha, P., y Agarwala, S. C. (1990). Interactive effect of boron and phosphorus on growth and metabolism of maize grown in refined sand. *Canadian Journal of Plant Science*, 70(2), 455-460. Recuperado el 29 de Octubre del 2015 de <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.4141/cjps90-053#.V-nDYljhDIU>.
- Chen J, Czajka D, Lion L, Shuler M y Ghiorse W. (1995). Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ. Health Perspect.* 103(2), 53-58. Recuperado el 28 de Febrero del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519318/>.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L. y Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415(6871), 545-549. Recuperado el 30 de Abril del 2016 de <http://www.nature.com/nature/journal/v415/n6871/abs/415545a.html>.
- Churchill, S. A., Walters, J. V., y Churchill, P. F. (1995). Sorption of heavy metals by prepared bacterial cell surfaces. *Journal of Environmental Engineering*, 121(10), 706-711. Recuperado el 30 de Octubre del 2015 de [http://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1995\)121:10\(706\)](http://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/(ASCE)0733-9372(1995)121:10(706)).

- Ciancaleoni, S., Chiarenza, G. L., Raggi, L., Branca, F., y Negri, V. (2014). Diversity characterisation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica Plenck) landraces for their on-farm (in situ) safeguard and use in breeding programs. *Genetic resources and crop evolution*, 61(2), 451-464. Recuperado el 30 de Octubre del 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s10722-013-0049-2>.
- COVENIN, (1987). *Agua. Determinación de boro*. Recuperado el 09 de Febrero del 2016 de <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/2420-87.pdf>
- D'Ambrosio, C. (Octubre del 2005). *Evaluación y selección de tecnologías disponibles para remoción de arsénico*. IIº Seminario Hispano-Latinoamericano sobre temas actuales de hidrología subterránea y IVº Congreso Hidrogeológico Argentino, Buenos Aires, Argentina. Recuperado el 29 de Octubre del 2015 de
- Drouillard, K., Norstrom, R., Fox, G., Gilman, A., y Peakall, D. (2003). Development and validation of a herring gull embryo toxicokinetic model for PCBs. *Ecotoxicology*, 12(1-4), 55-68. Recuperado el 27 de Octubre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12739857>.
- Espinoza, E. (2014). Brócoli: Segundo producto no tradicional más importante de la Sierra ecuatoriana. *Revista El Agro*, 2(211), 1-29. Recuperado el 25 de Octubre del 2015 de
- Esringü, A., Turan, M., Güneş, A., y Karaman, M. R. (2014). Roles of *Bacillus megaterium* in Remediation of Boron, Lead, and Cadmium from Contaminated Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45(13), 1741-1759. Recuperado el 23 de Octubre del 2015 de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103624.2013.8751?journalCode=lcss20>.
- Faisal, M., y Hasnain, S. (2004). Comparative study of Cr (VI) uptake and reduction in industrial effluent by *Ochrobactrum intermedium* and *Brevibacterium* sp. *Biotechnology letters*, 26(21), 1623-1628. Recuperado el 30 de Octubre del 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s10529-004-3184-1>.

- FAO. (2006). *Ficha técnica del Brócoli. Programa de Desarrollo de la Agroindustria Rural de América Latina y el Caribe*. Recuperado el 20 de Noviembre del 2015 de <http://www.fao.org/3/a-ae620s.pdf>.
- Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez R., Zegarra, H., Hernández, R., Reyes, M., Flores, D. y Arce, J. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Instituto Mexicano de petróleos, Ciudad de México. Recuperado el 15 de Noviembre del 2015 de <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/509.pdf>.
- Ferrol, N., y Donaire, J. P. (1992). Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Science*, 86(1), 41-47. Recuperado el 25 Octubre de 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016894529290177N>.
- Fertilab. (2013). *Manual de muestreos de suelos, plantas y aguas*. Laboratorio de Análisis Agrícolas, Ciudad de México. Recuperado el 28 de Noviembre del 2016 de <http://www.fertilab.com.mx/Sitio/Vista/Manual-de-Muestreo-3ra-Edicion.pdf>.
- Fisk, A., Norstrom, R., Cymbalisky, C., y Muir, D. (1998). Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(5), 951-961. Recuperado el 16 de Octubre del 2015 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620170526/full>.
- Fomina, M., y Gadd, G. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource technology*, 2(160), 1-43. Recuperado el 28 de Noviembre del 2014 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468322>.
- Gadd, G. (1990). Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46(8), 834-840. Recuperado el 25 de Marzo del 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007/b=BF01935534>.

- Ganie , M., Akhter, F., Bhat, M., Malik, A., Junaid, J., Shah, M., Bhat., A y Bha,T. (2013). Boron a critical nutrient element for plant growth and productivity with reference to temperate fruits. *Journal Current Science*, 104(1), 76-85. Recuperado el 22 de Diciembre del 2015 de <http://www.currentscience.ac.in/Volumes/104/01/0076.pdf>.
- García, R., Campos, J., Cruz, J. A., Calderón, M. E., Raynal, M. E., & Buitrón, G. (2016). Biosorption of Cd, Cr, Mn, and Pb from aqueous solutions by *Bacillus* sp strains isolated from industrial waste activate sludge. *TIP*, 19(1), 5-14. Recuperado el 16 de Diciembre del 2015 de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1405888X16000024?via=sd&cc=y>.
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmerson, M., Morales, M. B.,... y Eggers, S. (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, 11(2), 97-105. Recuperado el 20 de Mayo del 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1439179109001388%20Persistent%20negative%20effects%20of%20pesticides%20on%20biodiversity%20and%20biological%20control%20potential%20on%20European%20farmland>.
- Hussein, H., Ibrahim, S. F., Kandeel, K., & Moawad, H. (2004). Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(1), 30-37. Recuperado el 18 de Marzo del 2016 de <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/249>.
- IICA. (2007). *Brócoli*. Recuperado el 29 de Enero del 2016 de <http://www.bionica.info/biblioteca/iica2007brocoliexportacion.pdf>
- INEC. (2014). *Estadísticas agropecuarias y ambientales, Uso y Manejo de Agroquímicos en la agricultura 2014*. Recuperado el 29 de Octubre del 2015 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webine>

c/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas2014/Modulo_Uso_y
_Manejo_de_Agroquimicos.pdf.

- Jamali, N., Ghaderian, S. M., y Karimi, N. (2014). Effects of cadmium and zinc on growth. *Environmental Engineering and Management Journal*, 13(12), 2937-2944. Recuperado el 08 de Diciembre del 2015 de http://omicron.ch.tuiasi.ro/EEMJ/pdfs/vol13/no12/Full/4_65_Jamali_11.pdf.
- Kabata-Pendias., A. (2011). *Trace Elements in Soil and Plants*. Estados Unidos: Editorial CRC press.
- Kamrin, M.A. (1997), *Pesticide profiles: Toxicity, environmental impact, and fate*. Nueva York, Estados Unidos: Editorial CRC press.
- Kasan, H. (1993). The role of waste activated sludge and bacteria in metal-ion removal from solution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 23(1), 79-117. Recuperado el 29 de Febrero del 2016 de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389309309388442?journalCode=best20>.
- Kim, S., Cheong, Y., Seo, D., Hur, J., Heo, J., y Cho, J. (2007). Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB 4 (*Bacillus* spp.). *Water Science & Technology*, 55(1-2), 105-111. Recuperado el 04 de Abril del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305129>.
- Le Gall, J. (2009). El brócoli en Ecuador: la fiebre del oro verde. Cultivos no tradicionales, estrategias campesinas y globalización. *Anuario americanista europeo*, 2(6), 261-288. Recuperado el 29 de Mayo del 2016 de <https://halshs.archives-ouvertes.fr/hal-00679543/>.
- Lindsay, J, y Riley T. (1994.) Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression. *Infection and Immunity*, 62(6), 2309-2314. Recuperado el 06 de Abril del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186513/>.
- Mackay, D., y Fraser, A. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental pollution*, 110(3),

- 375-391. Recuperado el 09 de Marzo del 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749100001627>
- MAGAP. (2013). *Boletín situacional del brócoli*, Recuperado el 10 de Octubre del 2015 de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/bsc-2014/brocoli-cultivo/descargables-brocoli/file/3762-boletin-situacional-brocoli-2013>
- MAGAP. (2014). *Boletín situacional del brócoli*, Recuperado el 20 de Noviembre del 2015 de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/BoletinesCultivos/2015/cBoletin%20situacional%20brocoli%202014%20actualizado.pdf>.
- MAGAP. (2015). *Informe de la producción y exportación de brócoli en el Ecuador*, Coordinación del sistema de información nacional.
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment international*, 30(2), 261-278. Recuperado el 30 de Marzo del 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412003001867>.
- Manosalvas, R. (2012), *Determinación de la efectividad de "Biol Biogest potencializado", como fuente nutricional complementaria en el cultivo de Brócoli (Brassica oleracea) en la provincia de Cotopaxi*. (Tesis de pregrado) Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. Recuperado el 18 de Diciembre del 2015 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4599/1/CD-4196.pdf>
- Marcos, E., Aguilar Gutiérrez, G., Cabrera-Maldonado, C., Guzmán-Flores, E., y Flores-Encarnación, M. (2011). El impacto biológico de los autoinductores bacterianos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(2), 104-111. Recuperado el 26 de Octubre del 2015 de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000200005.
- Mateo, P., Bonilla, I., Fernandez-Valiente, E., y Sanchez-Maeso, E. (1986). Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena* sp. PCC 7119. *Plant physiology*, 81(2), 430-433. Recuperado el 20 de Diciembre de 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1666483>.

- McSpadden Gardener, B. B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 94(11), 1252-1258. Recuperado el 23 de Noviembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944463>.
- Miller, M., y Bassler, B. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199. Recuperado el 26 de Abril del 2015 de <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.micro.55.1.165>.
- Miwa, H., Ahmed I., Yoon J., Yokota A., y Fujiwara T. (2008). *Variovorax boronicumulans* sp. nov., a boron-accumulating bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (58) 286-289. Recuperado el 30 de Octubre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18175723>.
- Miwa, H., y Fujiwara, T. (2009). Isolation and identification of boron-accumulating bacteria from contaminated soils and active sludge. *Soil Science and Plant Nutrition*, 55(5), 643-646. Recuperado el 20 de Noviembre del 2015 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.17470765.2009.00402.x/abstract>.
- Moon, J., Kim, J., Ahn, Y., y Shibamoto, T. (2010). Analysis and anti-elicobacter activity of sulforaphane and related compounds present in broccoli (*Brassica oleracea* L.) sprouts. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6672–6677. Recuperado el 30 de Octubre del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20459098>.
- Moreno, S., y Rodríguez, J. (2013). *Determinación de las propiedades índices y mecánicas de los suelos expansivos en la vía San Mateo- Esmeraldas zona de Winchele, realizado los ensayos con agua potable y con agua de mar*. (Tesis de masterado) Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Pichincha, Ecuador. Recuperado el 07 de Abril del 2016 de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/6236>.
- Moraga, N., Poma, H., Amoroso, M., y Rajal, V. (2014). Isolation and characterization of indigenous *Streptomyces* and *Lentzea* strains from soils containing boron compounds in Argentina. *Journal of basic*

- microbiology*, 54(6), 568-577. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23686918>.
- Ozturk, M., Sakcali, S., Gucel, S., y Tombuloglu, H. (2010). Boron and plants. *In Plant Adaptation and Phytoremediation*. 275-311.
- Parks, J y Edwards, M. (2005). Boron in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35(2), 81-114. Recuperado el 29 de Septiembre del 2015 de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643380590900200>.
- Perfil del Brócoli en el Ecuador (2009). Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones. Recuperado el 09 de Febrero del 2016 de <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/brocoli.pdf>.
- Pino, F. y Pérez, D. (1983). *Análisis de elementos-traza por espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible*. España: Editorial San Pablo.
- Pírez, M., y Mota, M. (2008). *Morfología y estructura bacteriana*. Temas de bacteriología y virología médica. Recuperado el 20 de Noviembre del 2015 de <http://biomasaxy.com/Biologia/Docs/Morfologia%20y%20estrucutra%20bacteriana.pdf>.
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2004). *Microbiología*. Madrid, España: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.
- PROECUADOR. (2016). *Agroindustria-Brócoli*. Recuperado el 20 de Noviembre del 2015 de <http://www.proecuador.gob.ec/compradores/ofertaexportable/agroindustria/>
- Raja, C., y Omine, K. (2012a). Characterization of boron resistant and accumulating bacteria *Lysinibacillus fusiformis* M1, *Bacillus cereus* M2, *Bacillus cereus* M3, *Bacillus pumilus* M4 isolated from former mining site, *Journal of Environmental Science and Health*, 47(10), 1341-1349. Recuperado el 09 de Octubre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571522>.
- Raja, C. E., y Omine, K. (2012b). Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. *African Journal of*

Biotechnology, 11(9), 2267-2275. Recuperado el 15 de Noviembre del 2015 de www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/100599/898

18.

- Rehman, A., Ali, A., Muneer, B., y Shakoory, A. R. (2007). Resistance and biosorption of mercury by bacteria isolated from industrial effluents. *Pakistan Journal of Zoology*, 39(3), 137-146. Recuperado el 14 de Mayo del 2016 de https://www.researchgate.net/profile/Abdul_Shakoory/publication/262027143_Resistance_and_Biosorption_of_Mercury_by_Bacteria_Isolated_from_Industrial_Effluents/links/0a85e53674299af630000000.pdf.
- Reid, R. (2014). Understanding the boron transport network in plants. *Plant and Soil*, 385(2), 1-13. Recuperado el 17 de Septiembre del 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s11104-014-2149-y>
- Rittmann, B., (2006), Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 24(6), 261-266. Recuperado el 15 de Octubre del 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779906001004>
- Romero, M., y Otero, A. (2010). Interceptación de señales de comunicación bacteriana en bacterias aisladas del medio marino, *Revista Real Academia Galega de Ciencias*, 29, 129-206. Recuperado el 08 de Octubre del 2015 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3887243>.
- Rosca, M., Hlihor, R., Cozma, P., Comanita, E., Simion, I. M., y Gavrilescu, M. (2015). *Potential of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metals removal in bioreactors*. Recuperado el 20 de mayo del 2016 de <http://ieeexplore.ieee.org/document/7391487/>.
- Rucks, L., García, F., Kaplán, A., Ponce de León, J., y Hill, M. (2004). *Propiedades físicas del suelo* (Tesis de Maestría). Universidad de la República: Facultad de agronomía. Montevideo, Uruguay.
- Sakamoto, T., Inui, Y. T., Uruguchi, S., Yoshizumi, T., Matsunaga, S., Mastui, M. y Fujiwara, T. (2011). Condensin II alleviates DNA damage and is essential for tolerance of boron overload stress in Arabidopsis. *The*

- Plant Cell*, 23(9), 3533 - 3546. Recuperado el 05 de Septiembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917552>.
- Sandoval, G. M. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-99. Recuperado el 18 de Octubre del 2015 de <http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428096010.pdf>.
- Santos, G., Rodella, A., Abreu, C., y Coscione, A. (2010). Vegetable species for phytoextraction of boron, copper, lead, manganese and zinc from contaminated soil, *Scientia Agricola*, 67(6), 713-719. Recuperado el 29 de Septiembre del 2015 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162010000600014.
- Senesi, N. (1989). Composted materials as organic fertilizers. *Science of the Total Environment*, 81, 521-542. Recuperado el 26 de Enero del 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0048969789901617>.
- Silver, S. (1994). Exploiting heavy metal resistance systems in bioremediation. *Research in microbiology*, 145(1), 61-67. Recuperado el 19 de Diciembre del 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522335>.
- Sleytr, U., Györvary, E., y Pum, D. (2003). Crystallization of S-layer protein lattices on surfaces and interfaces. *Progress in Organic Coatings*, 47(3), 279-287. Recuperado el 06 de Noviembre del 2015 de <http://documentslide.com/documents/crystallization-of-s-layer-protein-lattices-on-surfaces-and-interfaces.html>.
- Smith, T., Grattan, S., Grieve, C., Poss, J., y Suarez, D. (2010). Salinity's influence on boron toxicity in broccoli: I. Impacts on yield, biomass distribution, and water use. *Agricultural water management*, 97(6), 777-782. Recuperado el 04 de Octubre del 2015 de https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/20360500/pdf_pubs/P2264.pdf
- Suárez, P., y Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 27(4), 160-

164. Recuperado el 03 de Marzo del 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33906702>.
- Tanaka, M., y Fujiwara, T. (2008). Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Journal of Physiology*, 456(4), 671-677. Recuperado el 29 de Noviembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965876>.
- Taniguchi, J., Hemmi, H., Tanahashi, K., Amano, N., Nakayama, T., y Nishino, T. (2000). Zinc biosorption by a zinc-resistant bacterium, *Brevibacterium* sp. strain HZM-1. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(4), 581-588. Recuperado el 30 de Abril del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092636>.
- Teitzel, G., y Parsek, M.(2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2313-2320. Recuperado el 19 de Mayo del 2016 de <http://aem.asm.org/content/69/4/2313.abstract>.
- Vecchio, A., Finoli, C., Di Simone, D., y Andreoni, V. (1998). Heavy metal biosorption by bacterial cells. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 361(4), 338-342. Recuperado el 06 de Febrero del 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s002160050899>.
- Verce, M., Stiles, A., Chong, K., y Terry, N. (2012). Isolation of an extremely boron-tolerant strain of *Bacillus firmus*. *Canadian journal of microbiology*, 58(6), 811-814. Recuperado el 04 de Abril del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22607488>.
- Velásquez, L., y Dussan, J. (2009). Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *Journal of hazardous materials*, 167(1), 713-716. Recuperado el 14 de Septiembre del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201532>.
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*, 2(3), 93-104. Recuperado el 20 de Octubre del 2015 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86320303>.

- Waters, C., y Bassler, B. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental Biology*, 21, 319-346. Recuperado el 14 de Marzo del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212498>.
- Yau, S, y Ryan, J. (2008). Boron toxicity tolerance in crops: a viable alternative to soil amelioration. *Crop Science*, 48(3), 854-865. Recuperado el 16 de Enero del 2016 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300904015>.

ANEXOS

ANEXO 1. Puntos muestreados en los cuatro campos.

CAMPO 1						CAMPO 4					
Mues tra	Largo (m)	Ancho (m)	Mues tra	Largo (m)	Ancho (m)	Mues tra	Largo (m)	Ancho (m)	Mues tra	Largo (m)	Ancho (m)
1	34,5	6	1	123	37	1	111	49,5	1	28,5	6
2	67,5	40	2	120	9,5	2	31,5	28	2	54	36
3	121,5	6	3	135	12,5	3	48	4	3	16,5	11,5
4	99	8,5	4	51	41,5	4	60	9	4	114	16,5
5	69	0,5	5	109,5	43	5	13,5	44	5	0	16
6	139,5	41,5	6	142,5	20	6	90	10,5	6	87	48,5
7	136,5	8,5	7	76,5	4,5	7	43,5	30,5	7	40,5	25,5
8	67,5	6,5	8	94,5	28,5	8	46,5	30	8	78	45,5
9	18	46	9	28,5	48,5	9	18	39	9	73,5	34
10	145,5	26	10	40,5	32	10	64,5	48,5	10	60	10

CAMPO 3						CAMPO 2					
Mues tra	Largo (m)	Ancho (m)	Mues tra	Largo (m)	Ancho (m)	Mues tra	Largo (m)	Ancho (m)	Mues tra	Largo (m)	Ancho (m)
1	9	37	1	145,5	9,5	1	18	22,5	1	111	40
2	148,5	10,5	2	18	18	2	120	40,5	2	28,5	45
3	84	16	3	108	5,5	3	18	33	3	37,5	17
4	12	20	4	34,5	38	4	25,5	23	4	124,5	36,5
5	27	4,5	5	49,5	0	5	1,5	46,5	5	129	47,5
6	132	30	6	48	29	6	124,5	45,5	6	60	25,5
7	31,5	14,5	7	145,5	13,5	7	25,5	22,5	7	13,5	31,5
8	91,5	15,5	8	76,5	26	8	19,5	6	8	85,5	9,5
9	90	6	9	136,5	24,5	9	138	48,5	9	145,5	13,5
10	117	21,5	10	102	20	10	78	41	10	97,5	46

ANEXO 2. Los cuatro campos de brócoli muestreados con diferentes estadios de crecimiento.



ANEXO 3. Recolección de muestras de suelo en cultivos de brócoli.



ANEXO 4. Medición de las coordenadas de cada campo.



ANEXO 5. Toma de la temperatura en cada punto de muestreo.



ANEXO 6. Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de bacterias acumuladoras de boro.

Reactivo	Cantidad
Peptona de caseína	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Cloruro de sodio	10 g/l
Agar	15 g/l
pH	7.0

ANEXO 7. Cuantificación del boro residual de cada caldo LB.



ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
 DE SUELOS, PLANTAS Y AGUAS
 Km 1, Panamericana Sur, Apdo... 17-01-340
 Telf. -Fax 3007284
 QUITO - ECUADOR

NOMBRE DEL PROPIETARIO: Karen Vásquez

FECHA DE MUESTREO : 11/02/2016

NOMBRE DEL REMITENTE:

FECHA INGRESO AL LABORATORIO: 12/02/2016

NOMBRE DE LA GRANJA: UNIVERSIDAD UDLA

FECHA DE SALIDA DE RESULTADOS: 19/02/2016

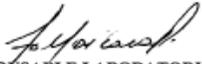
LOCALIZACIÓN: Quito Pichincha
 PARROQUIA CANTÓN PROVINCIA

INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS DE ABONOS ORGÁNICOS

No. Laborat.	Identificación	pH	dS/m		g/100ml (%)						mg/l (ppm)					
			C.E	C/N	N TOTAL	P	K	Ca	Mg	S	M.O	B	Zn	Cu	Fe	Mn
952	M 29											1.5				
953	M 310											2.5				
954	M 27											1.7				
955	M 16											1.8				
956	M 46											1.8				

METODOLOGÍA USADA:

BORO: POR COLORIMETRÍA CURCUMINA EN MEDIO ACIDO


 RESPONSABLE LABORATORIO


 LABORATORISTA

ANEXO 8. Características de las colonias bacterianas aisladas del suelo.

San Cristóbal I (89 días)								
Código de aislamiento	Pigmentación	Tamaño	Superficie	Forma	Borde	Consistencia	Característica óptica	Estructura interna
BorA11	Blanca	Grande	Plana	Irregular	Ondulado	Creмоса	Opaca	Lisa
BorA12	Blanca	Pequeña	Plana	Irregular	Espiculado	Creмоса	Opaca	Lisa
BorA13	Café	Pequeña	Plana	circular	Redondeado	Grasienta	Opaca	Lisa
BorA14	Blanca	Grande	Plana	Irregular	Ondulado	Creмоса	Opaca	Lisa
BorA15	Naranja	Pequeña	Plana	circular	Redondeado	Creмоса	Opaca	Lisa
BorA16	Blanca	Grande	Plana	Irregular	Lobulado	Creмоса	Opaca	Lisa
BorA17	Blanca	Pequeña	Plana	Circular	Redondeado	Creмоса	Opaca	Lisa
BorA18	Blanca	Pequeña	Plana	Circular	Redondeado	Creмоса	Translúcida	Lisa
BorA19	Blanca	Grande	Plana	Irregular	Ondulado	Creмоса	Opaca	Rugosa
BorA110	Rosada	Pequeña	Plana	Circular	Redondeado	Creмоса	Opaca	Lisa
San Cristóbal II (39 días)								
BorB21	Blanca	Pequeña	Plana	Irregular	Ondulado	Grasienta	Opaca	Lisa
BorB22	Café	Pequeña	Convexa	Irregular	Ondulado	Grasienta	Opaca	Lisa
BorB23	Café	Pequeña	Convexa	irregular	Lobulado	Seca	Translúcida	Rugosa
BorB24	Rosada	Pequeña	Planoconvexa	Circular	Redondeado	Creмоса	Opaca	Lisa
BorB25	Blanca	Grande	Plana	Irregular	Ondulado	Creмоса	Opaca	Rugosa
BorB26	Café	Pequeña	Plana	Circular	Ondulado	Grasienta	Translúcida	Lisa
BorB27	Blanca	Pequeña	Plana	Irregular	Lobulado	Grasienta	Translúcida	Lisa
BorB28	Rosada	Pequeña	Plana	Irregular	Lobulado	Seca	Translúcida	Rugosa
BorB29	Café	Grande	Convexa	Circular	Ondulado	Grasienta	Opaca	Lisa
BorB210	Café	Pequeña	Plana	Circular	Ondulado	Grasienta	Translúcida	Lisa

San Cristóbal III (80 días)								
Código de aislamiento	Pigmentación	Tamaño	Superficie	Forma	Borde	Consistencia	Característica óptica	Estructura interna
BorC31	Rosada	Grande	Plana	Irregular	Rizoide	Cremosa	Translúcida	Rugosa
BorC32	Blanca	Grande	Plana	Circular	Redondeada	Grasienta	Opaca	Lisa
BorC33	Café	Grande	convexa	Circular	Redondeada	Cremosa	Opaca	Lisa
BorC34	Blanca	Pequeño	Plana	Circular	Ondulada	Seca	Translúcida	Lisa
BorC35	Blanca	Grande	Plana	Circular	Redondeada	Cremosa	Opaca	Lisa
BorC36	Café	Grande	Convexa	Circular	Redondeada	Cremosa	Opaca	Lisa
BorC37	Amarilla	Pequeño	Plana	Circular	Redondeada	Cremosa	Translúcida	Lisa
BorC38	Café	Pequeño	Convexa	Circular	Redondeada	Cremosa	Opaca	Lisa
BorC39	Blanca	Grande	Plana	Circular	Ondulada	Seca	Opaca	Lisa
BorC310	Verde	Pequeño	Convexa	Circular	Redondeada	Grasienta	Translúcida	Lisa
Era vieja I (35 días)								
BorD41	Rosada	Pequeño	Convexa	Circular	Redondeada	Cremosa	Opaca	Lisa
BorD42	Blanca	Pequeño	Plana	Irregular	Ondulada	Grasienta	Opaca	Lisa
BorD43	Amarilla	Pequeño	Convexa	Circular	Redondeada	Cremosa	Translúcida	Lisa
BorD44	Amarilla	Pequeño	Plana	Circular	Redondeada	Cremosa	Translúcida	Lisa
BorD45	Café	Grande	Convexa	Circular	Redondeada	Grasienta	Opaca	Lisa
BorD46	Blanca	Grande	Plana	Circular	Redondeada	Cremosa	Opaca	Rugosa
BorD47	Crema	Pequeño	Plana	Circular	Redondeada	Cremosa	Translúcida	Lisa
BorD48	Blanca	Grande	Plana	Irregular	Ondulada	Cremosa	Opaca	Lisa
BorD49	Rosada	Pequeño	Plana	Circular	Redondeada	Seca	Translúcida	Lisa
BorD410	Blanca	Grande	Plana	Irregular	Redondeada	Cremosa	Opaca	Rugosa