MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL MICROORGANISMOS EN SUELOS, AGUAS, PLANTA, MATERIALES ORGÁNICOS:

DE LA TEORÍA A LA PRÁCTICA



Pontificia Universidad JAVERIANA Bogotá

Asociación porkcolombia

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA COMERCIAL

Reservados todos los derechos
@Pontificia Universidad Javeriana
@Aura Marina Pedroza-Rodriguez,
María Mercedes Martínez Salgado,
Rodrigo Ortega Blu, Marcela Franco-Correa,
Claudia Marcela Rivera Hoyos,
Luis David Gómez Méndez,
Lucía Ana Díaz Ariza, Luis Camilo Jiménez,
Juan Carlos Salcedo Reyes,
Ana Karina Carrascal-Camacho,
Adriana Inés Paéz Morales,
Raúl Alberto Poutou-Piñales,
Adriana Matiz Villamil

Primera edición: mayo de 2024
ISNB: 978-958-781-925-0

Hecho en Colombia
Made in Colombia

Editorial Pontificia Universidad Javeriana
Carrera 7 N° 37 - 25- oficina 1301
Bogotá, Edificio Lutaima
Teléfono: 601 320 8320 Ext. 4205
www.javeriana.edu.co/editorial
editorialpuj@javeriana.edu.co

Diseño de pauta: Manolo Perdomo

Diseño de cubierta: Manolo Perdomo

Pontificia Universidad Javeriana
Vigilada Mineducación.
Reconocimiento como Universidad.
Decreto 1270 del 30 de mayo de 1964.
Reconocimiento como personería jurídica:
Resolución 73 del 12 de diciembre
del Ministerio de Gobierno.



MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
MICROORGANISMOS EN SUELOS, AGUAS, PLANTA, MATERIALES ORGÁNICOS:

DE LA TEORÍA A LA PRÁCTICA

Pontificia Universidad JAVERIANA Bogotá

Asociación porkcolombia

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA COMERCIAL

EDITORES

AURA MARINA PEDROZA RODRÍGUEZ

Bacterióloga, MSc. PhD. Profesor titular II,
Departamento de Microbiología,
Facultad de Ciencias.
Pontificia Universidad Javeriana.
Bogotá, Colombia.

MARÍA MERCEDES MARTÍNEZ SALGADO

Microbióloga. MSc. PhD.
Investigadora de la Universidad de Bonn.
Alemania.

RODRIGO ORTEGA BLU

Ingeniero Agrónomo. MSc. PhD.
Académico del Departamento de Ingeniería Comercial.
Universidad Técnica Federico Santa María,
Santiago de Chile, Chile.

AUTORES POR CAPÍTULOS

RODRIGO ORTEGA BLU. Ingeniero Agrónomo. PhD.

VIVIANA GUTIÉRREZ ROMERO. Microbióloga M.Sc.

MARCELA FRANCO CORREA. Microbióloga M.Sc. PhD.

AURA MARINA PEDROZA RODRÍGUEZ. Bacterióloga. M.Sc. PhD.

MARÍA MERCEDES MARTÍNEZ SALGADO. Microbióloga M.Sc. PhD.

CLAUDIA MARCELA RIVERA HOYOS. Bióloga. M.Sc. PhD.

LUIS DAVID GÓMEZ MÉNDEZ. Microbiólogo M.Sc. PhD.

RENE NOVO. Ingeniero Agrónomo M. Sc., PhD (Profesor Emerito) QEPD.

LUCIA ANA DÍAZ ARIZA. Microbióloga. M.Sc.

NATALIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ. Microbióloga Industrial.

LUIS CAMILO JIMÉNEZ. Físico matemático. Maestría en Física.

JUAN CARLOS SALCEDO REYES. Físico. PhD. F.M.

MARÍA CLAUDIA CAMPOS PINILLA. Bacterióloga M.Sc. PhD.

ANA KARINA CARRASCAL CAMACHO. Bacterióloga M.Sc.

EDWIN DAVID MORALES. Biólogo. M.Sc. Ph.D.

FIDSON JUARISMY VESGA PÉREZ. Bióloga. M.Sc. PhD.

ADRIANA INÉS PÁEZ MORALES. Microbióloga Industrial. MSc.

RAÚL ALBERTO POUTOU PIÑALES. BQ., M.Sc., PhD.

ILLIANA CHAMORRO. Microbióloga Industrial. M.Sc.

ADRIANA MATIZ VILLAMIL. Bacterióloga. M.Sc.

LUCAS DAVID PEDROZA CAMACHO. Ingeniero Ambiental y Sanitario. Biólogo.

JUAN CAMILO LORES ACOSTA. Ingeniero Ambiental y Sanitario.

JUAN FELIPE MATEUS MALDONADO. Microbiólogo Industrial. M.Sc.

NICOLAS YUSEB BULLA. Microbiólogo Industrial. Estudiante de Maestría en Ingeniería Ambiental.

NELSON ALEJANDRO AMAYA OROZCO. Ingeniero Químico.

COEDITORES

DIANA CORINA ZAMBRANO, Microbióloga Industrial. Ph D.
ANA KARINA CARRASCAL CAMACHO. Bacterióloga, M. Sc.
CLAUDIA MARCELA RIVERA HOYOS. Bióloga, Ph. D Ciencias biológicas.

TABLA DE CONTENIDO

Presentación del libro / Pág. 31

Capítulo 1 Pág. 33

Importancia del muestreo de suelos en el análisis microbiológico
y su correlación con otras propiedades del suelo, agua y ambiente

1.1. Muestreo de suelos 35
1.1.1. Introducción 35
1.1.2. Objetivos de muestreo de suelos 36
1.1.3. Métodos de muestreo de suelos 36
1.1.3.1. Muestreo simple al aza 36
1.1.3.2. Muestreo estratificado al azar 37
1.1.3.3. Muestreo compuesto 38
1.1.4. Variabilidad espacial de las propiedades químicas del suelo 39
1.1.5. Dependencia espacial 39
1.1.6. Herramientas de muestreo 39
1.1.7. Fuentes de error 40
1.1.8. Profundidad del muestreo 40
1.1.9. Variación estacional de las profundidades del suelo 40
1.1.10. Recomendaciones para el muestreo de suelos 40
1.2. Muestreo de pilas de compost y materiales orgánicos apilados 42
1.2.1. Muestreo de materiales orgánicos 42
1.3. Recomendaciones para la recolección de muestras de suelo para análisis microbiológico 42
1.4. Materiales 43
1.5. Metodología 43
1.6. Referencias 43

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 2 / Pág. 45

Ecología y relaciones microbianas

2.1.	Introducción	47
2.1.1.	Ecología microbiana	47
2.1.2.	Interacciones microbianas	48
2.1.3.	Control biológico de microorganismos fitopatógenos	48
2.2.	Objetivos	50
2.3.	Materiales, reactivos y medios de cultivo	50
2.3.1.	Enfrentamiento dual interacción hongo-hongo	50
2.3.2.	Interacción bacterias no filamentos-hongo	51
2.3.3.	Interacción bacteria filamentosa-hongo	51
2.3.4	Interacción bacteria-bacteria	51
2.4.	Equipos	51
2.5.	Metodología	51
2.5.1.	Enfrentamiento dual interacción hongo-hongo	51
2.5.2.	Interacción bacterias no filamentosa-hongo	50
2.5.3	Interacción bacteria filamentosa-hongo	52
2.5.4	Interacción bacteria-bacteria	52
2.6.	Referencias	53

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 3 / Pág. 57

Ciclo del Carbono: Transformación de polímeros de origen natural

3.1.	Introducción	59
3.1.1.	Foras de carbono en el ambiente: Suelo, agua y aire	59
3.1.2.	Mineralización aeróbica de la materia orgánica. Humificación directa	61
3.1.3.	Humificación indirecta, producción de sustancias húmicas	64
3.1.4.	Biotransformación o mineralización anaeróbica de la materia orgánica	65
3.2.	Objetivos	66
3.3	Materiales, reactivos y medios de cultivo	66
3.3.1.	Actividades enzimáticas semi cuantitativas	66
3.3.2	Grado de condensación o formación de sustancias húmicas	66
3.4.	Equipos	67
3.5.	Metodología	67
3.5.1.	Recuento de microorganismos productores de proteasas, lipasas, amilasas, pectinasas y celulasas	67
3.5.2.	Actividad lacasa y manganeso peroxidasa semicuantitativa en agar extracto salvado de trigo con inductores	67
3.5.3.	Degradación de lignina bajo tres condiciones nutricionales	68
3.5.4	Determinación del grado de condensación y/ humificación	68
3.6.	Referencias	69

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 4 / Pág. 73

Ciclo del carbono: Transformación de hidrocarburos y plásticos

4.1. Introducción 75
4.1.1. Degradación de hidrocarburos y derivados 75
4.1.2. Degradación de plástico 77
4.2. Objetivos 78
4.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo 78
4.3.1. Inducción de la producción de biosurfactantes 78
4.3.2. Pruebas semi cuantitativas para la producción de biosurfactantes 78
4.3.3. Pruebas de emulsificación in vitro 78
4.3.4. Degradación de láminas de polietileno de baja densidad (PEBD) 78
4.3.4.1. Pretratamientos por fotólisis de las láminas de PEBD 78
4.3.4.2. Biodegradación de las láminas de PEBD 78
4.4. Equipos 79
4.5. Metodología 79
4.5.1. Inducción de la producción de biosurfactantes 79
4.5.2. Pruebas semi cuantitativas para la producción de biosurfactantes 79
4.5.3. Pruebas de emulsificación in vitro 79
4.5.4. Degradación de láminas de polietileno de baja densidad (PEBD) 80
4.5.4.1. Determinación de la hidrofobicidad de las láminas de PEBD (Medición del ángulo de contacto estático) 80
4.5.4.2. Ensayos de biotransformación de láminas de PEBD 81
4.6. Referencias 81

Capítulo 5 / Pág. 85

Ciclo del nitrógeno

5.1.	Introducción	87
5.1.1.	Fijación de nitrógeno atmosférico	88
5.1.2.	Oxidación y reducción de nitrógeno	90
5.2.	Objetivos	92
5.3.	Materiales, medios de cultivo reactivos	92
5.3.1.	Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno asociativos o simbióticos a partir de raíces de arveja, frijol, trébol, alfalfa u otra leguminosa nodulada: Rhizobium sp.	92
5.3.2.	Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno no asociativos: Azotobacter sp.	92
5.3.3.	Aislamiento de microorganismos microaerofílicos de nitrógeno asociativos	92
5.3.4.	Curva de calibración para la detección de nitrato (NO_3- - como producto de la oxidación de amonio)	93
5.3.5.	Curva de calibración para la detección de amonio (NH_4+ - Como producto de la reducción asimilativa de NO_3=)	93
5.3.6	Determinación de número más probable (NMP) para microorganismos nitrificantes y denitrificantes	93
5.4.	Equipos	93
5.5.	Metodología	93
5.5.1.	Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno asociativos o simbióticos a partir de raíces de arveja, frijol, trébol, alfalfa u otra leguminosa nodulada: Rhizobium sp.	93
5.5.2.	Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno no asociativos: Azotobacter sp.	94
5.5.3.	Aislamiento de microorganismos microaerofílicos de nitrógeno asociativos	94
5.5.4.	Curva de calibración para la detección de nitrato (NO_3- - como producto de la oxidación de amonio)	95
5.5.5.	Curva de calibración para la detección de amonio (NH_4+ - Como producto de la reducción asimilativa de NO_3=)	95
5.5.6.	Determinación de número más probable (NMP) para microorganismos nitrificantes y denitrificantes	96
5.6.	Referencias	98

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 6 / Pág. 101

Ciclo del fósforo

6.1. Introducción 103
6.1.1. Solubilización de fósforo 105
6.1.2. Mineralización de fósforo 106
6.1.3. Micorrizas, simbiosis para la inmovilización y transferencia de fósforo 106
6.1.3.1. Tipos de micorrizas 106
6.2. Objetivos 109
6.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo 109
6.3.1. Recuento de microorganismos solubilizadores de fósforo 109
6.3.2. Actividad fosfatasa alcalina 109
6.3.3. Actividad fitasa 109
6.3.4. Colonización de hongos formadores de micorriza arbuscular en raíces 110
6.3.5. Análisis de fósforo en suelo 110
6.4. Equipos 110
6.5. Metodología 110
6.5.1. Recuento de microorganismos solubilizadores de fósforo 110
6.5.2. Actividad fosfatasa alcalina 111
6.5.3. Actividad fitasa 111
6.5.4. Metodología de reconocimiento de estructuras de Micorrizas, aclarado y tinción de raíces 112
6.5.5 Análisis de fósforo en suelo 112
6.5.5.1. Preparación de la muestra 112
6.5.5.2. Procedimiento de extracción 112
6.5.5.3. Cuantificación de fósforo disponible mediante para el método de P-Olsen 113
6.5.5.4. Cálculos de la concentración de P-Olsen en suelo 113
6.6. Referencias 113

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 7 / Pág. 117
Ciclo del azufre

7.1	Introducción	119
7.1.1.	Reacciones de óxido-reducción asociadas al ciclo del Azufre: Columna de Winogradsky, como modelo	122
7.1.2.	Corrosión electroquímica	124
7.2.	Objetivos	125
7.3.	Materiales, reactivos y medios de cultivo	125
7.3.1.	Montaje de columna de Winogradsky	125
7.3.2.	Número mpas probable de bacterias sulfato reductoras	125
7.3.3.	Enriquecimiento de Thiobacillus	125
7.3.4.	Corrosión electroquímica	126
7.4.	Equipos	126
7.5.	Metodología	126
7.5.1.	Montaje de columna de Winogradsky	126
7.5.2.	Número mpas probable de bacterias sulfato reductoras	126
7.5.3.	Enriquecimiento de Thiobacillus	127
7.5.4	Corrosión electroquímica	127
7.6.	Referencias	127

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 8 / Pág. 131

Tratamiento de aguas residuales

8.1. Introducción 133
8.1.2. Tratamiento de aguas residuales 134
8.2. Objetivos 140
8.3 Materiales, medio y reactivos 140
8.3.1. Preparación del lodo activado fúngico/bacteriano 140
8.3.2. Montaje de la planta piloto 140
8.3.3. Clariflocculador de la biomasa algal (prueba de jarras) 140
8.3.4. Determinación de parámetros físicos 140
8.3.4.1. Color verdadero y unidades de color por el método espectrofotométrico 140
8.3.4.2. Determinación de sólidos totales, suspendidos, disueltos y sedimentables 140
8.3.4.3. Determinación de pH por el método potenciométrico 141
8.3.4.4. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) por el método de oxido reducción con dicromato de potasio 141
8.3.4.5. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno al quinto día (DBO_5) por el método de respirométrico 141
8.3.4.6. Determinación de carbono orgánico total (COT) por el método termo químico de oxidación con persulfato de amonio 141
8.3.4.7. Determinación de Nitrógeno total por el método oxidación con persulfato, amonio (NH4+) por el método de salicilato, nitratos y nitritos (NO_3=) por el método de reducción de Cadmio y nitritos NO_2- por el método del sulfato ferroso 141 141
8.3.4.8. Determinación de sulfatos (SO_4=) por el método de sulfato de Bario 141
8.3.4.9. Determinación de ortofosfatos (PO_4^{3-}) por el método del ácido ascórbico 141
8.3.4.10. Análisis microbiológico para microorganismos responsables de la biotransformación o lodo fúngico/bacteriano 141

8.3.4.11. Análisis microbiológico para coliformes termotolerantes por NMP

8.3.4.11.1.Técnica de fermentación de tubos múltiples (Standard Methods 9221 E), la identificación de los coliformes termotolerantes se basa en la capacidad de fermentar la lactosa a 44,5 °C ± 0,2 °C en 24 ± 2 h. utilizando el Caldo A1.

8.3.4.11.2. Técnica de multicelda (NMP/100 mL utilizando la técnica de Colillert®

8.4. Equipos

8.5. Metodología

8.5.1. Preparación del lodo activado fúngico/bacteriano

8.5.2. Montaje de la planta piloto pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario

8.5.2.1. Pretratamiento

8.5.2.2. Tratamiento primario (trampa de grasas)

8.5.2.3. Tratamiento secundario (reactor de los activados modificados)

8.5.2.4. Sedimentación secundaria

8.5.2.5. Tratamiento terciario (microalgas)

8.5.2.6. Prueba de jarras para determinar la dosis de coagulante

8.5.2.7. Floculación/coagulación terciaria para la recuperación de las microalgas

8.2.5.8. Fotocatálisis con TiO2/UV

8.5.2.9. Filtración con arena cuarcítica

8.5.3. Determinación de parámetros físicos

8.5.3.1. Determinación de color verdadero, unidades de color y curva espectral

8.5.3.2. Determinación de sólidos

8.5.3.2.1. Sólidos totales por el método gravimétrico

8.5.3.2.2 Sólidos sedimentables

8.5.3.2.3. Sólidos suspendidos totales

8.5.3.2.4. Sólidos disueltos totales

8.5.4. Determinación de parámetros químicos

8.5.4.1 Determinación de pH

8.5.4.2 Determinación de conductividad eléctrica por el método de conductividad eléctrica con sensor de conductividad

8.5.4.3. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

8.5.4.4. Determinación de la concentración de carbono orgánico total (COT)) por el método de termoquímico de oxidación con persulfato de amonio
8.5.4.5. Determinación de la Demanda bioquímica de oxígeno al quinto día (DBO5)
8.5.4.6. Determinación de NT, amoniacal, nitratos y nitritos
8.5.4.6.1. Nitrógeno total por el método de oxidación con persulfato de amonio
8.5.4.6.2. Determinación de nitrógeno amoniacal por el método del método de salicilato
8.5.4.6.3. Determinación de nitratos por el método de reducción de Cadmio
8.5.4.6.4. Determinación de nitritos por el método del sulfato ferroso
8.5.4.7. Determinación de sulfatos por el método del sulfato de Bario
8.5.4.8. Determinación de ortofosfatos por el método del ácido ascórbico
8.5.5. Análisis microbiológico para los microorganismos responsables de la biotransformación o consorcio fúngico/bacteriano
8.5.6. Análisis microbiológico para coliformes termotolerantes por NMP: Técnica de Fermentación de tubos múltiples (Standard Methods 9221 E)
8.5.7. Análisis microbiológico para coliformes termotolerantes por NMP: por la técnica de multicelda (NMP/100 mL) utilizando el sustrato definido Colilert®-18.
8.6. Referencias

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 9 / Pág. 157

Bacteriófagos como indicadores de contaminación acuática

9.1. Introducción
9.2. Objetivos
9.3. Reactivos y medios de cultivo
9.4. Equipos
9.5. Metodología
9.5.1. Inoculación de Escherichia coli WG5 para su crecimiento exponencial en medio MSB
9.5.2. Preparación del inóculo de E. coli WG5
9.5.3. Preparación de la muestra
9.5.4. Determinación y cuantificación de colifagos somáticos en aguas residuales

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 9 / Pág. 157

Bacteriófagos como indicadores de contaminación acuática

9.1. Introducción
9.2. Objetivos
9.3. Reactivos y medios de cultivo
9.4. Equipos
9.5. Metodología
9.5.1. Inoculación de Escherichia coli WG5 para su crecimiento exponencial en medio MSB
9.5.2. Preparación del inóculo de E. coli WG5
9.5.3. Preparación de la muestra
9.5.4. Determinación y cuantificación de colifagos somáticos en aguas residuales

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 10 / Pág. 167

Montaje para evaluación de toxicidad en aguas con Lactuca sativa (Mc Innis)

10.1. Introducción
10.2. Objetivos
10.3. Materiales, medios y reactivos
10.3.1. Preparación de las diferentes concentraciones del agua residual
10.3.2. Montaje del bioensayo
10.4. Equipos
10.5. Metodología
10.6. Referencias

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 11 / Pág. 177

Transformación y aprovechamiento de residuos orgánicos sólidos

11.1. Introducción
11.1.1. Valorización de residuos orgánicos a través de un modelo de economía circular
11.1.2. Compostaje
11.1.3. Biogas y biodigestatos
11.1.4. Sustratos de siembra
11.1.5. Conversión termoquímica o pirólisis- biochar
11.2. Objetivos
11.3. Materiales, reactivos y medios de cultivos
11.3.1. Sistemas de transformación de materiales orgánicos bajo fermentación sólida aeróbica en microcosmos
11.3.2. Evaluación del crecimiento vegetal en sustratos de siembra
11.3.3. Producción de biochar
11.3.4. Caracterización física y química de residuos orgánicos y bio-productos
11.4. Equipos
11.5. Metodología
11.5.1. Sistemas de fermentación en sólido aeróbicos a escala de microcosmos in vitro
11.5.2. Evaluación del crecimiento vegetal en sustratos de siembra
11.5.2.1. Preparación del material vegetal
11.5.2.2. Preparación de los sustratos de siembra
11.5.2.3. Siembra del material vegetal
11.5.2.4.Medición del crecimiento vegetal
11.5.3. Producción de biochar
11.5.4. Determinación del porcentaje de humedad
11.5.5. Determinación de pH

11.5.6. Determinación de materia orgánica y carbono orgánico total (COT) para materiales sólidos
11.5.7. Determinación del grado de condensación E4/E6
11.5.8. Determinación del grado de condensación y contenido de lignina
11.6. Referencias

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 12 / Pág. 193
Inocuidad microbiológica e indicadores de madurez en enmiendas orgánicas

12.1. Introducción
12.1.1. Indicadores de madurez
12.1.2. Inocuidad microbiana en enmiendas orgánica
12.1.2.1.Bacterias patógenas
12.2. Objetivos
12.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo
12.3.1. Método 1682 para Salmonella (U.S. EPA, 2006)
12.3.2. Método 1680. Número más probable usando caldo lauril sulfato y medio EC para coliformes fecales (U.S. EPA, 2004)
12.3.3. Ensayos de fitotoxicidad de los biomateriales obtenidos con uso en fertilización
12.3.4. Actividades enzimáticas en enmiendas orgánicas
12.3.4.1.Actividad fosfatasa
12.3.4.2. Actividad amonio monoxigensa
12.3.4.3. Concentración de amonio en compost y materiales orgánicos
12.4. Equipos
12.5. Metodología
12.5.1. NMP para Salmonella de acuerdo al método 1682 (EPA, 2006)
12.5.1.2. Determinación de sólidos totales
12.5.1.3. Análisis de datos y cálculos
12.5.2. Método 1680. Número más probable usando caldo lauril sulfato y medio EC para coliformes fecales (U.S. EPA, 2004)
12.5.3. Fitotoxicidad (Basado en el método propuesto por Zucconi, 1981)
12.5.4. Actividades enzimáticas

12.5.4.1. Actividad fosfatasa
12.5.4.2. Amonio monoxigenasa
12.5.4.3. Concentración de amonio en suelo
12.5.4.3.1. Preparación de la muestra
12.5.4.3.2. Cuantificación de Nitrógeno amoniacal (N-NH4), mediante el Método azul de indofenol
12.6. Referencias
13. Herramientas moleculares, ómicos y biológicas sintéticas: Aplicación ambiental
13.1. Introducción
13.2. Investigación del genoma
13.3. Genómica funcional
13.4. Biología de sistemas
13.5. Ingeniería genética y biología sintética
13.6. Protocolo básico para el análisis de la distribución temporal y espacial de comunidades microbianas en un modelo de ecosistema como las columnas de Winogradsky
13.7. Referencias
14 Anexos
14.1 Anexo A. Preparación de medios de cultivo
14.2. Anexo B. Preparación de reactivos y soluciones

LISTADO DE TABLAS

1/ Enzimas que participan en la mineralización y/o humificación directa de la materia orgánica en suelo
2/ Diferentes rutas de la degradación de plásticos
3/ Ejemplos de microorganismos diazótrofos simbióticos y de vida libre reportados en el suelo
4/ Cálculos para preparación de soluciones Stock curva patrón de nitratos
5/ Cálculos para preparación de soluciones Stock curva patrón de amonio
6/ Tipos de micorriza
7/ Operaciones unitarias para plantas de tratamiento de aguas residuales
8/ Parámetros físicos, químicos y microbiológicos a monitorear en una planta de tratamiento para aguas residuales domésticas y no domésticas
9/ Volumen de muestra por serie de tubos para análisis de coliformes termotolerantes
10/ Interpretación de resultados para Colilert®
11/ Bacteriófagos utilizados para evaluar contaminación de origen fecal en aguas y las diferencias en la técnica de doble capa en agar según ISO
12/ Normas sobre los requisitos que debe cumplir las enmiendas orgánicas para cultivos
13/ Ejemplo para el cálculo para NMP/g de Salmonella sp.
14/ Ejemplo de cálculo para NMP
15/ Métodos de secuenciación del ADN
16/ Genes de uso frecuente para la evaluación de grupos funcionales microbianos específicos en una muestra ambiental

LISTADO DE FIGURAS

1/ Diseño de muestreo sistemático alineado
2/ Pruebas de interacción in vitro para hongos.
(A) Interacción hongo-hongo, crecimiento influenciado.
(B) Interacción hongo-hongo, crecimiento no influenciado o libre.
(C) Crecimiento miceliar influenciado en presencia de una actinobacteria.
(D) Interacción actinobacteria-hongo
3/ Pruebas de interacción para bacterias in vitro.
(A) Interacción bacteria-hongo: Crecimiento miceliar influenciado.
(B) Crecimiento miceliar libre del fitopatógeno.
(C) Interacción negativa entre bacterias Gram negativas.
(D) Inhibición entre bacterias Gram negativas.
(E) Interacción negativa entre bacterias Gram positivas.
(F) Inhibición entre bacterias Gram positivas
4/ Transformación de la materia orgánica en suelo asociado con el proceso de humificación aeróbica y anaeróbica
5/ Hidrólisis de polímeros in vitro asociada con procesos de humificación directa.
(A) Microorganismos productores de proteasas an agar leche.
(B) Microorganismos productores de lipasas en agar tributirina.
(C) Microrganismos productores de amilasas en agar almidón.
(D) Microorganismos productores de celulasas en agar celulosa.
(E) Microorganismos productores de lacasa en agar extracto salvado de trigo con sal de diamonio 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), (ABTS).
(F) Microorganismos productores de pectinasas en agar pectina

LISTADO DE FIGURAS

6/ Selección de microorganismos productores de biosurfactantes.
(A) Colonias positivas para la producción de biosurfactantes en agar Siegmund and Wagner (SW).
(B) Colonias de Pseudomonas fluorescens productoras de pigmentos fluorescentes.
(C) Pruebas de emulsificación in vitro empleando biosurfactantes y diferentes derivados del petróleo
7/ Gotas de agua desionizada sobre una lámina de polietileno de baja densidad PEBD. Mediciones a la gota de agua para determinar el ángulo de contacto estático
8/ Ciclo general del Nitrógeno en suelo
9/ Aislamiento y recuento de microorganismos fijadores de N2.
(A) Azospirillum lipoferum en Agar Rojo Congo;
(B) Rhizobium sp. en Agar YMA;
(C) Prueba de NMP positiva para fijadores de N2 microaerófilos;
(D) Azospirillum lipoferum en médio semisólido NFB
10/ Resultado de las curvas patrón para la determinación de nitrato y amonio
11/ Posibles resultados del NMP/g de suelo a partir de clado amonio y caldo nitrato
12/ Ciclo general del fósforo
13/ Solubilización de fósforo inorgánico.
(a) Agar SMRS1.
(b) Agar Pikovskaya
14/ Esporas de diferentes Glomeromycota aislados de suelos colombianos. Acaulospora colombiana en PVGL, pared de germinación y pared externa.
b. Acaulospora colombiana en PVGL con Melzer.
c. Espora con hifa de suspensión

LISTADO DE FIGURAS

15/ Estructuras intraradicales de hongos formadores de micorriza arbuscular observadas a través de la coloración de xx con un aumento de 40 x
16/ Ciclo general del azufre
17/ Sistemas de transformación bifásica para estudio de ciclo del azufre en la columna de Winograsdky
18/ Enriquecimiento de bacterias oxidadoras de azufre en medios para Thiobacillus neutrófilos y Thiobacillus acidófilos y número más probable de bacterias sulfato reductoras (BSR) en caldo API y Thiobacillus.
19/ Sistema in vitro para la evaluación de corrosión electroquímica.
20/ Esquema de la planta de tratamiento a escala piloto.
21/ Diluciones seriadas salteada pares
22/ Diluciones seriadas salteada impares
23/ Cuantificación de Coliformes termotolerantes por el método sustrato enzimático Colilert® - 18, formato multicelda (utilizando la cepa de Klebsiella variicola ATCC 31488)
24/ Agar Scholtens modificado (MSA) inoculado con la cepa E. coli WG5 y la muestra de agua residual evaluada tras 24 h de incubación a 37 °C. Se observan las placas de lisis por la acción del bacteriófago.
25/ Resultados del ensayo de toxicidad aguda con Lactuca sativa
26/ Comparación entre transformación aeróbica y anaeróbica
27/ Montaje de microcosmos
28 / Esquema de la Degradación anaeróbica de los residuos orgánicos animales o vegetales

LISTADO DE FIGURAS

29/ Crecimiento de en diferentes sustratos de siembra: a y b. Semillas germinadas en papel de germinación y turba; c y d. Plantas de tomate
30/ Ensayos de fitotoxicidad para materiales orgánicos frescos y transformados
31/ Curva patrón de amonio
32/ Diferentes niveles de integración (ADN, ARN, proteínas y metabolitos) en las técnicas de microbiología molecular para el estudio de un solo tipo de microorganismo o comunidades microbianas
33/ Esquema general para el estudio de la distribución temporal y espacial de las comunidades microbianas en columnas de Winogradsky

PRESENTACIÓN DEL LIBRO

Cuando se piensa en microbiología ambiental, casi podríamos estar pensando en el papel de los microorganismos en el ambiente. Sin embargo, queda la duda de lo que se considera ambiente, y ahí es cuando se descubre que el área de estudio de la microbiología ambiental no se suscribe a un solo objeto de estudio, sino que incluye los más diversos y muchas veces extraños lugares.

Suelo, agua, aire, son los ecosistemas globales que involucran a la microbiología ambiental y con ello la participación de los microorganismos para lograr efectos positivos en los mismos. Desarrollo de inoculantes para agricultura, evaluación de agentes biocidas para el control de organismos causantes de deterioro ambiental o metodologías para el control de calidad de aire y aguas, son algunas de las técnicas que se incluyen en este Manual de Microbiología Ambiental.

Se pretende ofrecer un material de apoyo a las asignaturas relacionadas con la microbiología ambiental, de manera que el estudiante adquiera la destreza y conocimiento práctico de estrategias que le permiten aproximarse al estudio de los microorganismos y su relación con distintos ambientes.

Este libro lo escribimos alumnos, colegas, amigos, a la memoria del Prof. René Novo Sordo, Ing. Agrónomo, Doctor en Microbiologia de Suelos, Profesor Emérito de la Universidad Agraria de la Habana, Cuba, quien contribuyó en diferentes países de Latinoamérica a la formación de numerosas generaciones de microbiólogos; escuelas de microbiología agrícola y desarrollos e innovación en el área de los bioproductos de origen microbiano. Su sencillez y claridad para transmitir conocimientos básicos y aplicados, quedarán en nuestra memoria.

El presente manual contó con el apoyo de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia, La Asociación Porkcolombia - FNP y la Universidad Técnica Federico Santa María. Santiago de Chile. Chile. A través de convocatoria Movilidad de profesores para desarrollar investigación con instituciones extranjeras de la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana. Propuesta No 20070. 2019.

El presente libro contiene un total de 13 capítulos, en cada uno de ellos se presenta una introducción, materiales, metodología y referencias, para realizar algunas determinaciones en laboratorio. Adicionalmente, el libro tiene dos anexos. El primero denominado con la letra A, presenta todos los medios de cultivo, composición y preparación. El segundo denominado con la letra B, presenta todos los reactivos utilizados y la forma de prepararlos.



Capítulo 1

IMPORTANCIA DEL MUESTREO EN EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y CORRELACIONES CON OTRAS PROPIEDADES DE SUELO, AGUA, Y AMBIENTE



Capítulo 1

IMPORTANCIA DEL MUESTREO EN EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y CORRELACIONES CON OTRAS PROPIEDADES DE SUELO, AGUA, Y AMBIENTE

Rodrigo Ortega Blu

1.1. Muestreo de suelos

1.1.1. Introducción

La etapa más crítica para el estudio de las propiedades biológicas del suelo y de otras matrices de interés es el muestreo. En efecto, la mayor dificultad radica en describir adecuadamente las propiedades de interés ya que éstas varían espacialmente, en longitud (X), latitud (Y), profundidad (Z), y temporalmente (época del año). Un correcto muestreo debe permitir describir, con una exactitud aceptable (lo más cerca del promedio verdadero), la característica deseada dentro del área a muestrear, así como tener una buena repetitividad. Esto significa que muestras desde una misma área de muestreo, tomadas por distintos operadores, debieran dar resultados similares dentro de un margen de error aceptable. Una gran proporción de los errores en los estudios microbiológicos se debe al inadecuado muestreo de suelos y al deficiente manejo de las muestras, previo a su ingreso al laboratorio. En el presente capítulo se discuten algunos conceptos claves en el muestreo de suelos tales como: tipos de muestreo, número de observaciones necesarias, dependencia espacial, etc., para finalmente entregar algunas recomendaciones prácticas. Estos conceptos son aplicables a cualquier matriz que se desee muestrear, sin embargo, al final de este capítulo se entregan recomendaciones específicas para otras matrices de especial interés, tales como compost y materiales orgánicos.

1.1.2. Objetivo del muestreo de suelos

El muestreo tiene como objetivo principal obtener información acerca de un suelo en particular. Estadísticamente, el objetivo es describir una población a través de la estimación de sus parámetros. Los principales parámetros de una población son el promedio (μ) y la desviación estándar (σ). En suelos, una población puede ser todo el suelo contenido en una cierta profundidad, un conjunto de lotes, un conjunto de unidades dentro de un lote, etc. En este caso consideraremos la población como un conjunto de volúmenes de suelo (tomados con un barreno tipo tubo) en un área determinada (ej. 31.830.989 barrenos de 2 cm de diámetro/ha) que serán analizados para propiedades biológicas de acuerdo a procedimientos estándar. Cada población posee ciertas características que la describen. Estas características pueden incluir, concentración de mesófilos totales (UFC/g), actividad enzimática, evolución de CO_2, etc. El valor verdadero de cada característica en la población es llamado parámetro. Estadísticamente, los parámetros más usados son el promedio y la desviación estándar. Así, con el muestreo se desea estimar los parámetros de la población, es decir, por ejemplo, estimar el contenido promedio de organismos mesófilos en una población, o su actividad enzimática promedio. Cuando se hace una muestra compuesta solo es posible estimar el promedio de la población, debido a que no hay repeticiones. Si se desea obtener ambos parámetros, es decir promedio y desviación estándar, las submuestras debieran analizarse separadamente.

> El muestreo tiene como objetivo principal obtener información acerca de un suelo en particular. Estadísticamente, el objetivo es describir una población a través de la estimación de sus parámetros.

1.1.3. Métodos de muestreo de suelos

1.1.3.1. Muestreo simple al azar

Una vez definida la población de estudio (ej. población de volúmenes de suelos) se extrae un número determinado de muestras desde el área a muestrear (lote, parcela), cada una de las cuales tiene la misma posibilidad de ser elegida. La posición de cada muestra dentro del área puede hacerse a través de la generación de coordenadas x, y aleatorias, o bien numerando todas las posibles muestras y extrayendo el número deseado de ellas.

De un muestreo simple al azar, pueden estimarse algunos parámetros de la población a través del cálculo de algunos estadísticos. Los más comunes son el promedio y la varianza (desviación estándar) (Ecuaciones 1 y 2).

$$y = \frac{\sum_{i}^{n} y_i}{n} \quad \text{Promedio}$$

(Ecuación 1)

$$S^2 = \frac{\sum_{i}^{n} (y_i - y)^2}{n - 1} \quad \text{Varianza}$$

(Ecuación 2)

La desviación estándar (s) corresponde a la raíz cuadrada de la varianza. El tamaño de la varianza (valor absoluto) es afectado por el tamaño de las unidades de medición de la propiedad de interés. Por ejemplo, para un mismo set de muestras, el contenido de materia orgánica (%) tendrá una menor varianza que la biomasa microbiana expresada en UFC/g. Para comparar la variación de distintas propiedades en una misma base, se calcula el coeficiente de variación que corresponde al % de la desviación estándar con respecto al promedio de cada propiedad medida, de acuerdo a la ecuación 3:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100 \quad \text{Coeficiente de variación}$$

(Ecuación 3)

A partir de la varianza también puede calcularse el error estándar (S_y) que indica el grado de error en la estimación del promedio de la población (Ecuación 4).

$$S_y = \sqrt{\frac{S^2}{n}} \quad \text{Error estándar}$$

(Ecuación 4)

El error estándar más un valor de t obtenido desde una tabla para un cierto nivel de confianza, permite calcular intervalos de confianza alrededor del promedio (Ecuaciones 5 y 6).

$$ls = y + t_{0,025} * s_y \quad \text{Límite superior}$$

(Ecuación 5)

$$li = y - t_{0,025} * s_{\bar{y}} \quad \text{Límite inferior}$$

(Ecuación 6)

De acuerdo a esta misma fórmula rearreglada, es posible calcular cuántas muestras se requerirían para estimar el promedio de la población con un cierto nivel de error a un nivel de probabilidad dado (Ecuación 7).

$$n = \frac{t^2 s^2}{D^2} \quad \text{Número de observaciones}$$

(Ecuación 7)

Dónde:

- t = valor de la tabla de t elegido arbitrariamente en primera instancia y modificado luego por reiteración (anexo)
- s = variancia de la muestra estimada de estudios o experiencias anteriores, o calculada de acuerdo al rango de valores esperado ($s^2 = (R/4)^2$)
- D = nivel de exactitud permitida (error) en la estimación del promedio, es decir que tan cerca se quiere estar del promedio de la población a través de la muestra.

Por ejemplo, se desea estimar el promedio de biomasa de microorganismos (expresada en UFC/g) en una población de volúmenes de suelo dada, con una probabilidad del 95% y un nivel de exactitud de 5 x10^5 UFC/g. El rango de valores estimados es de 2 x 10^5 a 1 x10^7 UFC/g.

Primero se elige un valor de t desde la tabla usando un número arbitrario de observaciones, por ejemplo, n =10, lo que significa 9 grados de libertad (gl), con los que con p=0,05 se obtiene un valor de t =2,262.

Se estima la varianza S^2

$$S^2 = \left(\frac{1x10^7 - 2x10^5}{4}\right)^2 = 6x10^{12} \left(\frac{UFC}{g}\right)^2$$

D = 3 x 10^5 UFC/g

Así, n será igual a:

$$\frac{[(2,262)^2 * 6x10^{12}]}{\lceil (5x10^5)^2 \rceil} = 123$$

Debido a que n = 123 es mucho mayor que n = 10, se debe hacer el cálculo nuevamente, hasta que el n de entrada sea igual al n de salida. En este ejemplo, se requerirían n=95 muestras (submuestras) para estimar el promedio de biomasa (UFC/g) con un 95% de confianza y 5 x 10^5 UFC/g de exactitud, que corresponde a un error de 10%. Ahora si se permitiera un error mayor, digamos 20%, el número de muestras requeridas disminuye a 25. Esto significa que mientras más cerca se desee estar del promedio de la población que se está estimando, mayor será el número de muestras necesarias.

1.1.3.2. Muestreo estratificado al azar

La población es dividida en un número determinado de subpoblaciones y muestreada al azar. Por ejemplo, el área a muestrear puede ser dividida por topografía, manejo, textura, etc. y cada unidad muestreada separadamente. Las razones técnicas para muestrear el suelo de esta manera incluyen:

1) hacer inferencias acerca de cada una de las sub-poblaciones (zonas) separadamente y

2) incrementar la precisión de las estimaciones (media, desviación estándar, etc.) sobre la población entera.

1.1.3.3. Muestreo compuesto

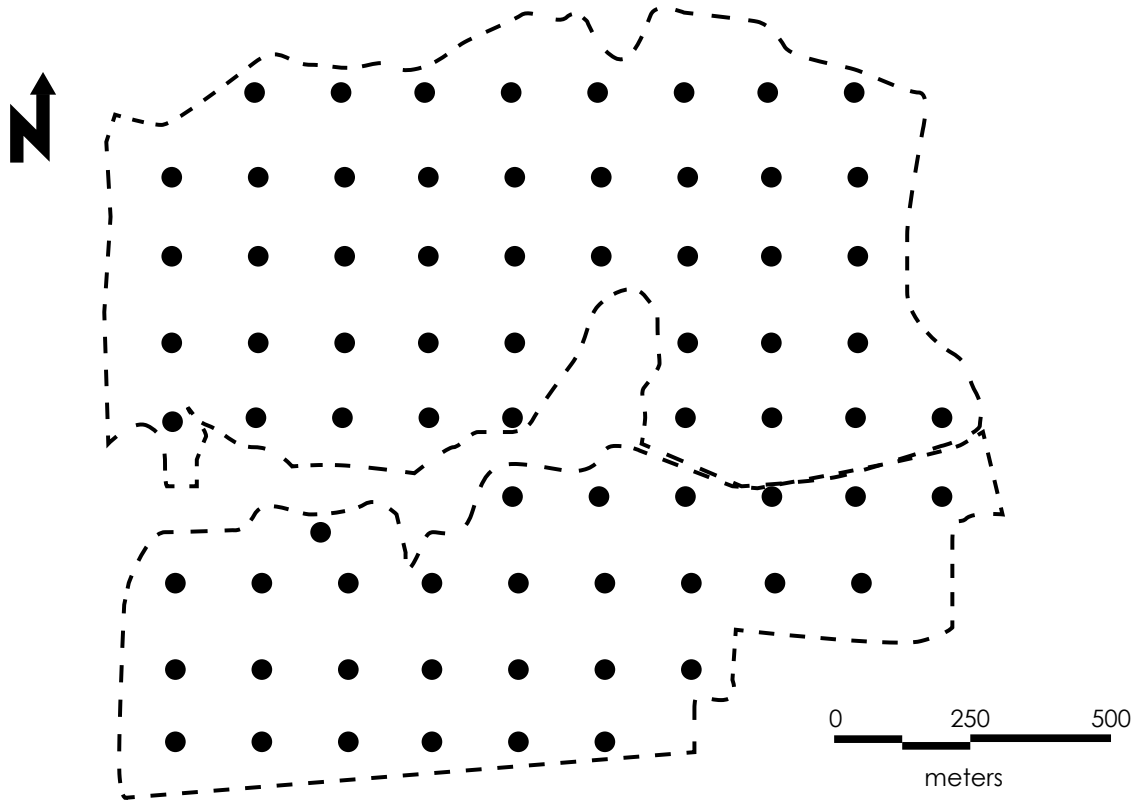
El muestreo compuesto es la forma más operativa de extraer muestras de suelo desde un área de muestreo. Básicamente es similar al muestreo simple al azar (o estratificado al azar) pero difiere de este en el sentido de que toda la unidad de muestreo es cubierta y no existen repeticiones ya que el suelo, proveniente de los puntos muestreados, es mezclado en una sola muestra. Además, la localización de las muestras no es al azar, sino que se sigue un cierto patrón, cuyo inicio y distanciamiento queda a juicio del operador.

En la práctica, debiera extraerse el número de submuestras determinadas a través del cálculo de n en una superficie que no debería exceder las 10 ha. Estas submuestras deben ser compuestas en una sola muestra que se envía al laboratorio. La composición de la muestra debe hacerse considerando igual volumen para cada submuestra.

Según la mayoría de las normas internacionales, en el caso de las propiedades químicas del suelo, deberían extraerse alrededor de 25 muestras, por cada unidad homogénea de muestreo la cual no debería exceder las 10 hectáreas. De acuerdo a antecedentes de literatura, poco se gana en precisión cuando se excede 25 puntos de muestreo. Asimismo, el coeficiente de variación no se afecta demasiado sobre un mínimo de 8 a 12 hectáreas. Si se requiriera una mejor estimación del promedio, el área debería ser subdividida en más sectores homogéneos. La ubicación dentro del área a muestrear se hace a juicio personal, siguiendo un recorrido en X o Zig – Zag, el cual, ha arrojado menores coeficientes de variación que el muestreo simple al azar, de acuerdo a algunos autores.

El muestreo sistemático (en grilla) arroja resultados muy satisfactorios dado que se cubre toda el área de interés (Figura 1). De hecho, este tipo de muestreo es el recomendado cuando se dispone de un receptor de GPS para navegar a cada punto de muestreo en una grilla predeterminada.

Figura 1.
Diseño de muestreo sistemático alineado.



1.1.4. Variabilidad espacial de las propiedades químicas del suelo

Las propiedades del suelo son altamente variables dentro de un área considerada visualmente homogénea. En la figura 2 se muestra la variabilidad espacial de la mineralización de N en un lote de 2 hectáreas. Se puede apreciar que incluso dentro de superficies tan pequeñas como la de la figura, las propiedades biológicas del suelo varían ampliamente. Por supuesto, la variabilidad aumenta a medida que se aumenta el tamaño de la superficie a muestrear, aunque de acuerdo a la literatura, este aumento no es muy significativo sobre las 12 hectáreas.

La mayor variabilidad está representada por aquellas propiedades susceptibles de sufrir rápidas oscilaciones en espacio y tiempo. Por esta razón se recomienda muestrear una superficie no superior a las 10 hectáreas.

1.1.5. Dependencia espacial

Los procedimientos estadísticos clásicos, en los cuales se basa el muestreo de suelos, asumen que las observaciones en el campo son independientes unas de otras no importando su ubicación en el terreno. Sin embargo, debido a la naturaleza continua del paisaje, a procesos de formación de suelos, y a zonas climáticas, es razonable esperar que exista autocorrelación (dependencia) espacial, es decir que muestras tomadas cerca unas de otras, sean más parecidas que muestras tomadas a mayor distancia entre ellas. La cuantificación de la dependencia espacial de propiedades del suelo es crítica para definir estrategias de muestreo adecuadas, debido a que, por un lado, aumentando el número de observaciones no necesariamente se aumenta la exactitud del estudio, pues se puede producir información redundante, mientras que, por otro, si se desea interpolar lugares no muestreados dentro del área de interés, para mapear la propiedad bajo estudio, se requiere dependencia espacial.

La dependencia espacial es usualmente cuantificada a través del uso de un variograma. Esta es una relación entre variancia y distancia entre muestras. Cuando las observaciones son independientes, la variancia entre las muestras es similar, no importando la distancia entre ellas, sin embargo, cuando las muestras son dependientes la variancia aumenta con el incremento de la distancia entre ellas. Un variograma típico tiene tres componentes: el *nugget*, que corresponde a la variancia entre muestras cuando la distancia entre ellas es cero y que correspondería al error de medición, el rango, que es la distancia a la cual las muestras se hacen independientes y el *sill* que corresponde al valor de variancia a la distancia = rango y que debe ser similar al valor de la variancia de todas las muestras.

Lamentablemente, la dependencia espacial es sitio y propiedad específica, por lo cual los parámetros obtenidos en suelos similares debieran tomarse solo como referencia. Respecto a las propiedades químicas, elementos más variables como el nitrógeno disponible tendrán rangos de dependencia espacial más cortos en comparación a propiedades más estables como el pH, por lo tanto, si se desea obtener muestras de suelo para propiedades de distinto rango, las distancias entre muestras debieran ser las de la propiedad de rango más corto. En el caso de propiedades biológicas, dada su elevada variabilidad, sus rangos de dependencia espacial son muy cortos, lo que significa que, si se desean mapear, debiera muestrearse con una alta intensidad. En la figura 9 se presentan mapas de la actividad de la enzima β-glucosidasa en suelos de Colombia.

1.1.6. Herramientas de muestreo

En la actualidad existe una gran oferta de equipos de muestreo que trabajan adecuadamente en la obtención de muestras de suelo. Estos varían desde herramientas manuales (palas, barrenos, etc.) hasta barrenos hidráulicos montados en vehículos todo terreno, tractores o camionetas.

La consideración más importante cuando se selecciona una herramienta de muestreo es que esta debe ser de fácil limpieza entre submuestras y que permita alcanzar la profundidad de muestreo deseada con exactitud. Los más usados son los barrenos manuales de tubo, los cuales debieran ser de acero inoxidable para una fácil limpieza y evitar óxidos que pudieran contaminar la muestra, especialmente cuando se desea determinar elementos traza. Los barrenos tipo

rosca son más efectivos que los de tubo para el muestreo de suelos pedregosos.

El recipiente en el cual se mezclan las submuestras es muy importante. El mejor es un balde plástico, debido a su bajo peso y su fácil limpieza. Además, no contamina la muestra con óxidos. En general, un buen equipo de muestreo debiera tener las siguientes características:

- Tomar una muestra pequeña, suficiente y de igual volumen en cada lugar de muestreo, de manera que la muestra compuesta sea de tamaño apropiado para el análisis de suelo.
- Ser fácil de limpiar.
- Adaptable a suelos arenosos secos como también a suelos arcillosos húmedos.
- Ser resistente a la oxidación y construido para resistir un posible doblamiento o quiebre.
- Ser fácil de usar.

Sin lugar a dudas, la característica más importante de una herramienta de muestreo es que debe proveer submuestras uniformes de igual volumen en todos los puntos de muestreo a ser mezclados en una muestra compuesta.

1.1.7. Fuentes de error

Los errores asociados al muestreo de suelos pueden caer en tres categorías:

- Error de muestreo: causado por el hecho de que la muestra incluye solo los puntos muestreados en vez de toda la población de puntos posibles de muestrear. La única posibilidad de eliminar el error es incluir en el muestreo a toda la población. En el cálculo del número de muestras (submuestras) necesarias se incluye este error.
- Error de selección: causado por la tendencia a seleccionar algunas unidades muestrales dentro de la población con mayor o menor frecuencia. Por ejemplo, evitar los sitios pedregosos del lote o sobremuestrear los bordes de un lote. El muestreo simple al azar puede eliminar parte de este sesgo.
- Error de medición: la medición observada no corresponde con el valor verdadero de la unidad muestreada. Normalmente el error de muestreo es mayor que el error de medición.

1.1.8. Profundidad de muestreo

La profundidad de muestreo, dependerá del objetivo del estudio y del manejo del suelo. Debe considerarse que, en general, la actividad biológica disminuye con la profundidad del suelo, al igual que lo hacen los contenidos de materia orgánica. La mayor actividad biológica se concentra normalmente en los cinco primeros cm de profundidad.

Para la mayoría de las propiedades del suelo en cultivos agrícolas, la profundidad de muestreo debe ser equivalente a la capa arable, es decir 20 cm. En cultivos en cero labranza y praderas fertilizadas, la profundidad usada es normalmente de 10 cm. Para el muestreo de suelos en futuro huerto frutal, se considera un muestreo por horizonte o estrata, hasta 1 m de profundidad. Para efectos de evaluación de la fertilidad de suelos frutales una profundidad de 30 cm es adecuada.

1.1.9. Variación estacional de las propiedades del suelo

Algunas propiedades bioquímicas del suelo varían estacionalmente, es decir su concentración en el suelo será distinta dependiendo de la época del año. La variación estacional en algunas propiedades, puede deberse a cambios en la actividad microbiológica, producto de cambios en la temperatura y la humedad del suelo (con efecto sobre propiedades como N, pH, P, etc.) y cambios en la concentración de sales, producto de la variación del contenido de humedad del suelo (pH del suelo). Para hacer seguimientos interanuales y minimizar los efectos de la variación estacional, deben establecerse épocas de muestreo definidas.

1.1.10. Recomendaciones para el muestreo de suelos

- Recordar que la mayor fuente de error del análisis de suelo proviene del muestreo de suelos.

•Hacer muestreo de suelos con suficiente antelación. Recordar que el tiempo promedio que toma un laboratorio en los análisis es entre 10 a 15 días.

•Cuando se muestree un área de interés para determinar la evolución interanual de propiedades de interés, debe hacerse siempre en la misma época.

•Si se conoce el área a muestrear, preparar un plan de muestreo a priori.

•Dividir el lote o área muestral en sectores homogéneos, de acuerdo a su topografía, manejo anterior u otro criterio visible o conocido. Recordar que cada área muestral no debería exceder las 10 hectáreas.

•Recorrer cada unidad de muestreo en X o zig-zag, cubriendo toda el área de interés. Evitar sectores no representativos tales como: entradas del lote, sectores de descarga de fertilizantes, desagües, etc. Idealmente establecer una grilla y colectar las submuestras en cada punto de la grilla.

•Colectar al menos 25 submuestras/área homogénea y colocarlas en un balde plástico limpio, para su posterior homogenización.

•Cuidar que el volumen de suelo muestreado sea similar en cada punto a muestrear. Vigilar la profundidad de muestreo si se usa barreno de tubo o pala y el ancho del prisma si se utiliza pala.

•Calcular que el volumen de suelo colectado, sea suficiente para los análisis requeridos. Recordar que se requiere al menos ½ litro (½ kilogramo) de suelo. Para determinar la cantidad mínima de puntos a muestrear, cuando se utiliza un barreno tipo tubo, usar la siguiente relación (Ecuación 8).

$$N = \frac{P}{[(0{,}79 D^2 L) * dap]}$$

(Ecuación 8)

Donde:

•N = número mínimo de puntos a muestrear para obtener P (g) de muestra.

•P = peso de la muestra compuesta deseado (g).

•D = diámetro interno del barreno de tubo (cm).

• L = profundidad de muestreo (cm).

•Dap = densidad aparente del suelo (g/cm^3) (use 1 si no la conoce)

•Mezclar bien el suelo en el balde y obtener una alícuota de al menos 500 g. de suelo.

•Identificar claramente el sector, lote y predio muestreado. No olvidar incluir la fecha de muestreo y cualquier información relevante. Seguir las instrucciones de su laboratorio.

•Enviar muestra inmediatamente al laboratorio. Mientras se envía, mantener la muestra refrigerada a 4 – 6 °C (sin congelar).

"Cuando se muestree un área de interés para determinar la evolución interanual de propiedades de interés, debe hacerse siempre en la misma época."

1.2. Muestreo de pilas de compost y materiales orgánicos apilados

1.2.1. Muestreo de materiales orgánicos

La heterogeneidad del compost y pilas de materiales orgánicos, puede ser aún más alta que aquella observada en suelos. Por eso el muestreo debe incluir un número suficiente de muestras; de lo contrario, los resultados no serán representativos de la realidad del material.

Para muestrear una pila de sustrato orgánico o compost, se aplican los mismos conceptos descritos para suelo: se deben colectar entre 20-25 submuestras, intentando cubrir la pila completamente. El muestreo sistemático también es recomendable en este caso, es decir, dividir la pila en celdas o grillas (cuadrantes) virtuales, de acuerdo a la intensidad requerida (ej. 20 celdas) y colectar una submuestra en cada una de ellas.

Si la pila ha sido volteada recientemente, la profundidad de muestreo es irrelevante, sin embargo, si la pila no ha sido volteada, es conveniente obtener una muestra de una profundidad que llegue al centro de la pila (ej. 0-100 cm); si esto no es factible, se pueden ir colectando muestras a distintas profundidades hasta llegar al centro de la pila (ej. 0-20 cm, 20-40 cm, 40-60 cm, 60-80 cm y 80-100 cm).

El volumen de material colectado en cada punto de muestreo debe ser homogéneo, por lo que debe usarse algún implemento de muestreo que permita su control, tal como un tubo de cloruro de polivinilo (PVC).

Según la TMECC, para una muestra compuesta, se toman 20 muestras al azar (5 profundidades de cada uno de 4 transectos en las pilas de compost) y se combinan en un recipiente limpio de 20 L. Mezclar y tomar una muestra de 0,75-1 Kg de muestra compuesta. Mantener la muestra refrigerada hasta que sea analizada.

Las muestras de materias primas deben tomarse antes de la preparación de las pilas, es decir, antes de la trituración o reducción de tamaño, y antes de la adición de nutrientes suplementarios, agentes de carga o de agua.

1.3. Recomendaciones para la recolección de muestras de suelo para análisis microbiológico

Cuando se va a realizar cualquier tipo de análisis al suelo ya sea químico, físico o microbiológico, la toma de la muestra debe reunir una serie de condiciones imprescindibles para que los resultados obtenidos puedan ser interpretados correctamente. Las condiciones son tres fundamentalmente:

La primera de ellas es que la muestra o muestras sean lo suficientemente representativas del área donde se colecten; esta condición se cumple si se colecta un número suficiente de submuestras, tal como se indicó anteriormente. La segunda condición requerida es que no se produzcan contaminaciones durante la colecta y el traslado de las muestras al laboratorio y, la tercera condición es la rápida ejecución del análisis microbiológico. Existen algunas investigaciones que señalan que muestras colectadas, refrigeradas o no, sufren grandes modificaciones en su biota entre los 2 y 14 días. Después de este tiempo y hasta 6 meses la biota se estabiliza. Independiente a ello, la mayoría de los autores recomiendan que las muestras colectadas se procesen en un lapso no mayor de las 48 horas.

Cuando se pretende estimar índices más generales como la capacidad de mineralización del nitrógeno, nitrificación o respiración, puede haber una mayor libertad en cuanto al tiempo entre la toma o colecta y el momento del análisis microbiológico, pero siempre se debe trabajar con la muestra de suelo lo más fresca posible.

La cantidad de suelo a recolectar dependerá de los análisis a realizar, no debiendo ser menor de 200 gramos para el conteo de microorganismos viables, mientras que para los métodos bioquímicos como respiración y nitrificación se requieren cantidades mayores de los 5 kilogramos.

Cuando las muestras se recolecten desde calicatas, es recomendable que el microbiólogo se haga acompañar del especialista de suelos con vista a realizar una descripción correcta del perfil y se proceda a realizar la caracterización química de las muestras.

1.4. Materiales

•Frascos de boca ancha o bolsas plásticas estériles.

•Cucharillas o espátulas de metal estériles.

•Palas, picos, tarjetas de cartón, hilo de algodón, libreta de anotaciones.

1.5. Metodología

•Elegir las zonas de muestreo y limpiar cuidadosamente la superficie del suelo de todo material extraño incluyendo la vegetación.

•Realizar un corte en forma de trinchera con la ayuda del pico y la pala de manera que no se produzcan derrumbes. Procure una buena iluminación orientando la cala de manera que el sol esté a su espalda iluminando la superficie puesta al descubierto.

•Con espátulas o cucharillas estériles tomar las cantidades de suelo requeridas siempre de abajo a arriba para evitar contaminaciones.

•Depositar en los recipientes adecuados.

•Anotar en los envases los datos de profundidad, tipo de suelo, vegetación existentes y demás datos que se consideren necesarios.

•Trasladar las muestras al laboratorio y realizar los análisis correspondientes antes de las 48 horas.

•Mezclar lo mejor posible las muestras colectadas bajo condiciones de asepsia sin utilizar las manos y pesar 10 gramos para determinar humedad del suelo.

•Si en el campo se tomaron submuestras separadas es posible realizar los análisis para cada muestra independiente o hacer una muestra total, procediendo igual que en el punto N° 6.

1.6. Referencias

Ameen, F., Reda, S., El-Shatoury, S., Riad, E., Enany, M., y Alarfaj, A. (2019). Prevalence of antibiotic resistant mastitis pathogens in dairy cows in Egypt and potential biological control agents produced from plant endophytic actinobacteria. Saudi Journal of Biological Sciences. 26 (7), 1492-1498.

Crépin, J., Johnson, RL. (1993). Soil sampling for environmental assessment. p. 5 – 18. In M. R. Carter (ed.) Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of soil Science. Lewis Publishers, USA.

INN., (1999). Norma Chilena NCh 2060-1999. Suelos-Muestreo para análisis de fertilidad. Primera edición 1999. 9 pp.

Kitchen, NR., Havlin, JK., Westfall DG. (1990). Soil sampling under no-till banded phosphorus. Soil Science Society American Journal. 54, 1661-1665.

Petersen, RG., Calvin LD. (1996). Sampling. p. 1-17. In J.M. Bartelset al. (ed.) Methods of soil analysis: Part 3. Chemical methods. 3rd edition. Book series no. 5. ASA and SSSA, Madison, WI.

Rojas, WC., Rodríguez, SN. (1997). Manual de muestreo para análisis de fertilidad. Servicio Agrícola y Ganadero. Departamento de Protección de los recursos Naturales Renovables. Santiago-Chile. 23 pp.

Sabbe, WE., Marx, DB. (1987). Soil sampling: spatial and temporal variability. p. 1-14. In J.R. Brown (ed.) Soil testing: sampling, correlation, calibration, and interpretation. SSSA Spec. Publ. 21. Madison, WI.

Test Methods for the Examination of Composting and Compost TMEC (2001). Sample Collection and Laboratory Preparation 02.01 Field Sampling of Compost Materials.



Capítulo 2

ECOLOGÍA Y RELACIONES MICROBIANAS



Capítulo 2

ECOLOGÍA Y RELACIONES MICROBIANAS

Viviana Gutiérrez Romero y Marcela Franco Correa

2.1. Introducción

2.1.1. Ecología microbiana

El desarrollo de las actividades biológicas en el planeta tierra es imprescindible para el mantenimiento de muchas especies entre ellas la microbiota, donde se estudia el comportamiento de cada microorganismo en su ambiente natural, debido al gran protagonismo que tienen en la dinámica de muchos ecosistemas (terrestres, acuáticos y aéreos); su papel en todos los ciclos biogeoquímicos es imprescindible en sistemas como el suelo, donde participan activamente en el área agrícola proporcionando la fertilidad del mismo (Sokol et al., 2022).

Entender la interacción entre los elementos bióticos y abióticos de un determinado ambiente, así como la forma en que interactúan las diversas comunidades de microorganismos y el papel de dicha interacción en cada ecosistema ha sido fundamental para entender el funcionamiento de la naturaleza. En los últimos años, con el desarrollo de las llamadas técnicas OMICA´s, se ha avanzado en el conocimiento no solo del microbioma, sino también de la ecología microbiana y su relación con los diferentes ambientes (Madigan et al., 2021; Ossowicki et al., 2021).

El microbioma del suelo incluye la totalidad de los microorganismos cultivables y no cultivables de un suelo, que a su vez forman diversas comunidades con funciones biológicas específicas y se regulan a través de relaciones entre genes y señalización. El microbioma participa en el ciclo de los diferentes elementos como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, entre otros. Afecta directamente la fertilidad del

suelo y está implicado en el almacenamiento de carbono en suelo con un efecto directo e indirecto sobre la salud de plantas y animales en ecosistemas terrestres (Naylor et al., 2020). Es por esto que es de gran relevancia conocer que tipo de comunidades existen en el suelo y cuales son las interacciones biológicas que se desarrollan entre ellas, para favorecer la transformación de los elementos a través de los diferentes ciclos biogeoquímicos y conocer cómo se pueden controlar aquellos microorganismos que bajo ciertas condiciones ambientales incrementan su población y pueden tener un efecto adverso para plantas (Naylor et al., 2020; Dhaliwal et al., 2022).

2.1.2. Interacciones biológicas

La microbiota de los diferentes ecosistemas están regulados por el mantenimiento de la estabilidad de las comunidades en ambientes variables (homeostasis); esta estabilidad es producida durante las asociaciones y/o interacciones positivas o negativas de todos los individuos que se encuentran en dicha comunidad. Dentro de una misma población pueden presentarse dichas interacciones, debido a que la microbiota coopera cuando las densidades celulares son bajas, pero compiten cuando son altas. Una población puede beneficiarse de otra en una relación comensal unilateral, o dos poblaciones diferentes pueden interaccionar sinérgicamente (Pii et al., 2015; Martínez et al., 2013; Ávila-Cortes et al., 2014; Boro et al., 2022). Dentro de estos aspectos intervienen los factores bióticos y/o abióticos que hacen parte del ecosistema donde estén habitando, lo que conlleva a que se generen patrones evolutivos internos que regulan las diferentes poblaciones que interactúan (Karimi et al., 2019).

2.1.3. Control biológico de microorganismos fitopatógenos

El control biológico y su sinónimo abreviado: "Biocontrol", ha sido ampliamente utilizado en los campos de la biología, especialmente en la entomología y en la fitopatología. En fitopatología el término se aplica a la utilización de microorganismos antagonistas (agente de control biológico) con el fin de suprimir las enfermedades, así como el uso de patógenos específicos de un huésped para el control de plantas arvenses (malezas), (Ávila-Cortes et al., 2014; Tariq et al., 2020; Boro et al., 2022). El control biológico es un método de gran potencial e importancia en cultivos, convirtiéndose en una de las alternativas que ofrecen un control duradero del patógeno u organismo nocivo. Dentro de los microorganismos más conocidos y estudiados para el control biológico se emplean hongos como *Trichoderma sp., Gliocladium sp., Penicillium sp., Beauveria bassiana, Beauveria brongniartii, Metarhizium anisopliae, Metarhizium flavoviride, Paecilomyces fumosoroseus, Lecanicilium (Verticillium) lecanii,* entre otros. También se incluyen bacterias como *Pseudomonas sp.*, diferentes especies de *Bacillus*, como *B. thuringiensis, B. subtilis, B. pumillus, B. polimixa*, entre otros. Por otro lado, bacterias del género *Serratia sp., Pantoea sp. y actinobacterias (ej. Streptomyces coelicolor)*, también han sido empleadas exitosamente para control biológico (Ávila-Cortés et al., 2014; Tariq et al., 2020; Bonaterra et al., 2022). Diferentes estudios han demostrado que el uso de microrganismos antagonistas y productos naturales pueden ser efectivos en el control de enfermedades postcosecha; por tal razón los agentes microbianos y sus productos derivados representan una alternativa de control segura y de baja toxicidad para el medio ambiente (Moraes et al., 2019).

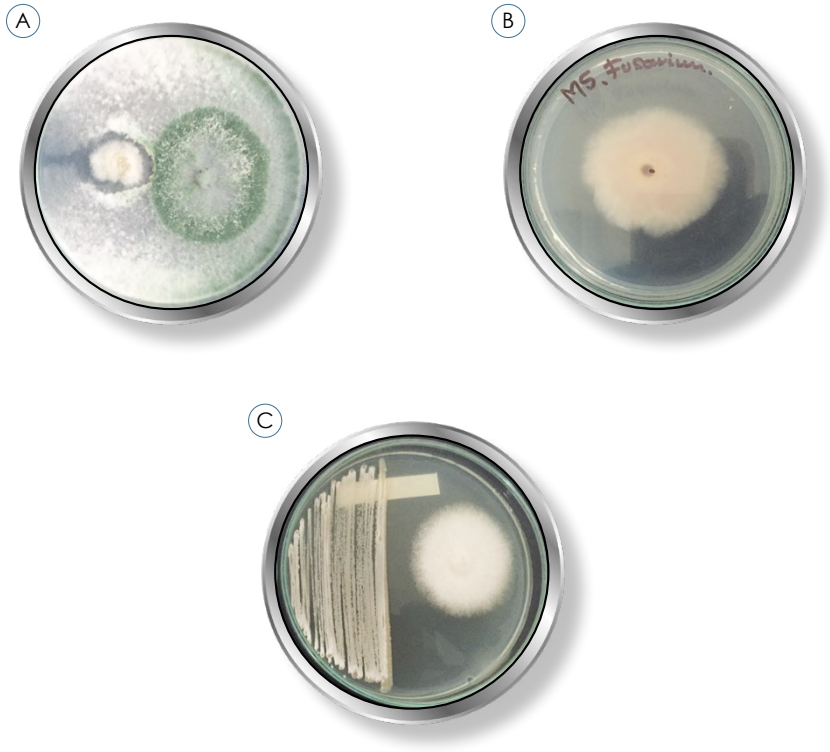
Las especies de *Trichoderma* han sido investigadas como agentes de control biológico (BCAs) de enfermedades asociadas con hongos fitopatógenos por cerca de 80 años (Shafawati et al., 2013; Ferreirra and Musumeci, 2021) y su éxito como BCAs, es consecuencia de su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes y promoción de crecimiento vegetal, capacidad para modificar la rizosfera, inducción de mecanismos de defensa (Ghazanfar et al., 2018) y antagonismo hongos fitopatógenos, mediante mecanismos como: competencia, antibiosis, micoparasitismo, inducción de resistencia sistémica, entre otros (Lecomte et al., 2016). El amensalismo, comúnmente denominado antibiosis, consiste en la secreción de metabolitos secundarios que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos. Entre los metabolitos secundarios inhibitorios se encuentran: trichodermina, gliovirina, gliotoxina, y compuestos furanónicos antimicrobiales como la 3-(1-hexanil)-5-hidroxi-5-metil-2,5 (H) furanona, y la 6-pentil-a-pirona

(Lecomte et al., 2016; Asad 2022), entre otros. La competencia ocurre principalmente por nutrientes, espacio y factores de crecimiento (Lecomte et al., 2016). Por último, el micoparasitismo no solamente consiste en la producción de enzimas líticas (quitinasas, celulasas y proteinasas), las cuales permiten la degradación de la pared celular del microorganismo patógeno (Reithner et al., 2011; Asad 2022), sino en la interacción entre sus estructuras que permiten la destrucción de algunas de las estructuras del patógeno huésped (ej: micelio, esporas y esclerocios), utilizándolos como una fuente de carbono y nitrógeno (Bhat, 2017; Ferreirra and Musumeci, 2021). Así mismo, *Trichoderma* es reconocido como elicitor, por su capacidad de producir compuestos con diferentes características químicas que sirven cmo activadores de reacciones defensivas en plantas. Estos compuestos son capaces de promover diferentes mecanismos de defensa como resistencia sistémica adquirida, resistencia sistémica inducida y resistencia local adquirida (Poveda et al., 2020; Asad 2022).

Otros de los microorganismos que han sido estudiados como biocontroloadores (BCAs), son las actinobacterias, las cuales presentan capacidad antagónica por medio de mecanismos como la antibiosis, siendo ésta la más estudiada. Algunas especies de actinobacterias tienen la capacidad de producir un amplio espectro de antibióticos y antifúngicos como metabolitos secundarios y una gran variedad de enzimas que hidrolizan la pared de los hongos, tales como: celulasas, hemicelulasas, quitinasas, amilasas, glucanasas, entre otras (Franco-Correa, M. & Chavarro, V., 2016; Ameen et al., 2019; Law et al., 2019), (Figura 2 y Figura 3).

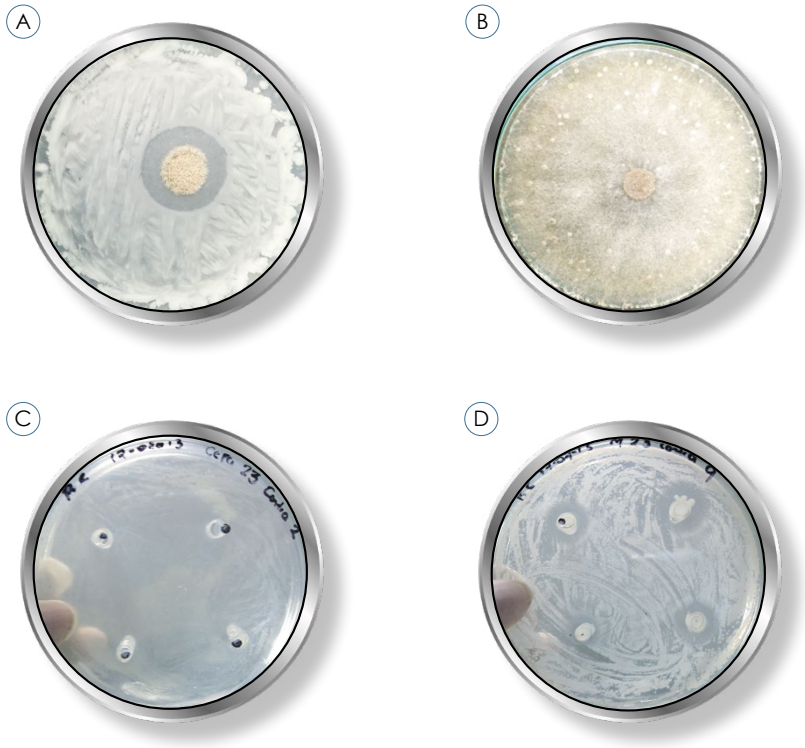
Figura 2.

Pruebas de interacción in vitro para hongos. (A) Interacción hongo-hongo, crecimiento influenciado. (B) Interacción hongo-hongo, crecimiento no influenciado o libre. (C) Crecimiento miceliar influenciado en presencia de una actinobacteria.



Cortesía de Viviana Gutierrez Romero.

Figura 3.
Pruebas de interacción para bacterias in vitro. (A) Interacción bacteria-hongo: Crecimiento miceliar influenciado. (B) Crecimiento miceliar libre del fitopatógeno. (C) Interacción negativa entre bacterias Gram negativas. (D) Inhibición entre bacterias Gram negativas.



Cortesía de Aura Marina Pedroza Rodríguez

2.2. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar in vitro algunas de las iteraciones positivas y negativas, que se pueden desarrollar entre microorganismos de diferentes géneros.

Objetivos específicos

- Evaluar las diferentes técnicas de antagonismo utilizadas para ensayos in vitro.
- Determinar los porcentajes de inhibición miceliar en las técnicas de antagonismo contra hongos.
- Determinar la inhibición en milímetros en las técnicas de antagonismo contra bacterias.

2.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo

2.3.1. Enfrentamiento dual interacción hongo-hongo

- 1 caja de Petri con agar papa dextrosa (PDA) sembrado con *Trichoderma harzianum* (anexo A, numeral 1).
- 1 caja de Petri con agar PDA sembrado con *Fusarium oxysporum.*
- 2 cajas de Petri con agar PDA.
- Aguja de disección recta.
- Bisturí.

2.3.2. Interacción bacteria no filamentosa-hongo

• 1 caja de Petri con Agar PDA sembrado con *Fusarium oxysporum*.

• 1 caja de Petri con agar nutritivo sembrado con una bacteria no filamentosa como *Bacillus* sp. o *Pseudomonas fluorescens* (anexo A, numeral 2).

• 2 cajas de Petri con agar PDA.

• Asa redonda.

• Aguja de disección recta.

2.3.3. Interacción bacteria filamentosa-hongo

•1 caja de Petri con Agar PDA sembrada con *Fusarium oxysporum*.

•1 caja de Petri con agar avena sembrada con una bacteria filamentosa como *Streptomyces* sp. (anexo A, numeral 3).

• 2 cajas de Petri con agar PDA.

• Asa redonda.

• Aguja de disección recta.

2.3.4. Interacción bacteria-bacteria

• 1 caja de Petri con agar nutritivo sembrada con bacteria Gram positiva o Gram negativa.

•1 caja de Petri con agar nutritivo sembrada con una bacteria Gram positiva o Gram negativa.

•1 caja de Petri con agar nutritivo PDA.

•Asa redonda.

2.4. Equipos

• Incubadora.

• Microscopio.

• Estereoscopio.

2.5. Metodología

2.5.1. Enfrentamiento dual interacción hongo-hongo

• Cortar con la aguja de disección o con el bisturí 3 cuadrados de 0,5 cm x 0,5 cm de agar con micelio de *Fusarium oxysporum*, y un cuadrado de las mismas dimensiones de agar con micelio de *Trichoderma harzianum*.

• En una de las cajas de Petri con agar PDA sembrar en la parte central el cuadrado de *Fusarium oxysporum* para evaluar el crecimiento libre o no influenciado por el microorganismo biocontrolador.

• Dividir la otra caja de Petri con agar PDA en 3 zonas iguales de 3 cm.

• En el primer segmento colocar el cuadrado con *Fusarium oxysporum*.

• En el segundo segmento colocar el cuadro con *Trichoderma harzianum*.

• Incubar a 25 °C durante 5 a 7 días.

• Medir diámetro de la colonia en milímetros del hongo a evaluar en los dos agares PDA y determinar la inhibición de crecimiento miceliar en la caja de Petri que contiene el posible hongo antagonista y el crecimiento libre en la caja de Petri que sólo tiene el hongo filamentoso (*Fusarium oxysporum*).

• Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar empleando la ecuación 9.

$$\%\ ICM = \frac{(CML - CMIb)}{(CML)} \times 100$$

$$ICM\ (\%) = \frac{(CML - CMIb)}{(CML)} \times 100$$

(Ecuación 9)

Dónde: **ICM** (%): Corresponde al porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar. CML: corresponde al crecimiento miceliar libre en milímetros. **CMI:** corresponde al crecimiento miceliar influenciado en milímetros.

2.5.2. Interacción bacteria no filamentosa-hongo

•Cortar con la aguja de disección o con el bisturí 3 cuadrados de 0,5 cm x 0,5 cm de agar con micelio de *Fusarium oxysporum*.

•En una de las cajas de Petri con agar PDA sembrar de forma masiva 0,1 mL de una suspensión bacteriana (*Bacillus sp.* o *Pseudomonas fluorescens*) con una concentración igual a $1x10^4$ células/mL y distribuir uniformemente con una espátula de vidrio.

•Dejar adsorber la suspensión por 5 minutos a 20 °C.

•Sembrar en la parte central de agar PDA inoculado con la suspensión bacteriana el cuadrado de *Fusarium oxysporum*. En esta caja se evalúa el crecimiento miceliar influenciado.

•En la otra caja de Petri con agar PDA sembrar en la parte central el cuadrado de agar con micelio de *Fusarium oxysporum* para evaluar el crecimiento libre o no influenciado.

•Incubar a 25 °C durante 5 a 7 días.

•Medir diámetro de la colonia en milímetros del hongo a evaluar en los dos agares PDA y determinar la inhibición de crecimiento miceliar en la caja que contiene la suspensión bacteriana y el crecimiento libre en la caja que sólo tiene el hongo filamentoso.

• Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar empleando la ecuación 9.

2.5.3. Interacción bacteria filamentosa-hongo

•Cortar con la aguja de disección o con el bisturí 3 cuadrados de 0,5 cm x 0,5 cm de agar con micelio de *Fusarium oxysporum*.

•En una de las cajas de Petri con agar PDA sembrar de forma masiva 0,1 mL de una suspensión de conidios (*Streptomyces sp.*) con una concentración igual a $1x10^4$ conidios/mL y distribuir uniformemente con una espátula de vidrio.

•Dejar adsorber la suspensión por 5 minutos a 20 °C.

•Sembrar en la parte central de agar PDA inoculado con la suspensión de conidios de la *actinobacteria* el cuadrado de agar con micelio de *Fusarium oxysporum*, para evaluar el crecimiento influenciado por la bacteria.

•En la otra caja de Petri con agar PDA sembrar en la parte central el cuadrado de *Fusarium oxysporum* para evaluar el crecimiento libre o no influenciado.

•Incubar a 25 °C durante 5 a 7 días.

•Medir diámetro de la colonia en milímetros del hongo a evaluar en los dos agares PDA y determinar la inhibición de crecimiento miceliar en la caja que contiene la suspensión de la actinobacteria y el crecimiento libre en la caja que sólo tiene el hongo filamentoso.

•Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar empleando la ecuación 9.

2.5.4. Interacción bacteria-bacteria

•Preparar una suspensión de cada una de las bacterias a evaluar en solución salina al 0,85 % (m/v) con una concentración de $1x10^6$ UFC/mL (anexo B, numeral 1).

•Sembrar en superficie y de forma masiva 0,1 mL de cada bacteria agar nutritivo.

•Distribuir homogéneamente sobre la caja con una espátula de vidrio y dejar adsorber 10 minutos a 20 °C.

•Colocar 4 anillos de plástico estériles de 1,0 cm de alto x 0,5 cm de diámetro, formando un cuadrado a una distancia de 3 cm entre anillos.

•Adicionar 0,1 mL de la bacteria a enfrentar con la que se sembró de forma masiva en el agar nutritivo.

•No invertir las cajas para evitar que la suspensión de microorganismos se salga de los anillos plásticos.

•Sembrar el control negativo de la misma forma que los tratamientos, pero en los anillos colocar 0,1 mL de solución salina al 0,85 % (m/v).

•Sembrar el control positivo de la misma forma que los tratamientos, pero en los anillos colocar 0,1 mL de un antibiótico de amplio espectro con una concentración de 100 mg/L.

•Incubar de 24 a 48 horas a 30 °C.

•Observar la formación de halos de inhibición en la zona aledaña al anillo la cual se considera como prueba de interacción positiva o inhibición del crecimiento bacteriano en mm. La bacteria sembrada en el anillo es la que inhibe a la que está sembrada de forma masiva.

2.6. Referencias

Ameen, F., Reda, S., El-Shatoury, S., Riad, E., Enany, M., Alarfaj, A. (2019). Prevalence of antibiotic resistant mastitis pathogens in dairy cows in Egypt and potential biological control agents produced from plant endophytic actinobacteria. Saudi Journal of Biological Sciences. 26 (7), 1492-1498.

Asad, S. (2022). Mechanims of action and biocontrol potential of Trichoderma against fungal plant diseases. A review. Ecologial Complexity.https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978.

Ávila, I., Rodríguez, M., Franco, M., Pedroza, A., y Gutiérrez, I. (2014). Use of agricultural wastes for biomass production of the plant growth promoter actinobacteria. Streptomyces sp. MCR26. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 2(5), 460-472.

Bhat, KA. (2017). A New Agar Plate Assisted Slide Culture Technique to Study Mycoparasitism of Trichoderma sp. on Rhizoctonia solani and Fusarium oxysporium. International Journal of Current Microbiology and Applied Science. 6(8), 3176-3180.

Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., et al. (2022). Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. Microorganims. https://doi.org/10.3390/microorganisms10091759.

Boro, M., Sannyasi, S., Chettri, D., et al., (2022). Microorganims in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: A review. Archives of Microbiology. https://doi.org/10.1007/s00203-022-03279-w.

Dhaliwal, S.S., Gupta, R., Singh, A.K., et al. (2022). Impact of cropping systems on pedigenic distribution and transformations of micronutrients, plants accumulations and microbial community compositions in soil: a review. Tropical Ecology. https://doi.org/10.1007/s42965-022-00272-8.

Franco-Correa, M., Chavarro-Anzola, V. (2016). Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. En D. Dhanasekaran, Y. Jiang. Actinobacteria. Basis and Biotechnological applications. Croacia: InTech. Pags, 249-270.

Ferreirra, F and Musumeci, M. (2021). Trichoderma as biological control: scope and prospects to improve efficacy. World Journal Microbiology and Biotechnology. https://doi.org/10.1007/s11274-021-03058-7.

Ghazanfar, U., Raza, M., Raza, W., Qamar, I. (2018). Trichoderma as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. Plant Protection. 2 (3).

Karimi, B., Dequiedt, S., Terrat, S. et al. Biogeography of Soil Bacterial Networks along a Gradient of Cropping Intensity. (2019). Sci Rep 9, 3812 https://doi.org/10.1038/s41598-019-40422-y

Law, F., Pusparajah, P., Mutalib, N., Wong, S., Goh, B. y Lee, L. (2019). A review on mangrove actinobacterial diversity: The roles of Streptomyces and novel species discovery. Progress In Microbes & Molecular Biology. 2 (1).

Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel, V., Robert, F., Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by Fusarium oxysporum: a review. Biological Control. 101, 17-30.

Martínez. M., Gutiérrez, V., Pedroza, A. (2013) Métodos Microbiológicos, físicos y químicos con aplicación ambiental. Manual de Microbiología. Chile: Editorial Universidad Federico Lleras San María 132p. p.

Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W., Stahl, D. (2021). Brock Biology of Microorganims.16 edición. Editorial Pearson.

Moraes-Bazioli, J., Belinato, JR., Henrique-Costa, J., Yuri-Akiyama, D., Moraes-Pontes, JG., Kupper, KC., Augusto, F., Carvalho, JE., Pacheco, FT. (2019). Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. Toxins. 11(8), 460.

Naylor, D., Sadler, N., Bhattacharjee, A., et al. (2020). Soil Microbiomes Under Climate Change and Implications for Carbon Cycling. Annual Review of Environmental and Resoyrces.45, 29-59.

Ossowicki, A., Raaijmakers, J., Garbeva, P. (2021). Minireview Disentangling soil microbiome functions by perturbation, Envirmental Microbiology Reports. 13, 582-590.

Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., et al., (2015). MIcrobial interactions in the rhizophere: benefical influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient adquisition process. A review. Biology Fertility Soil. DOI 10.1007/s00374-015-0996-1.

Poveda, J., Abril-Urias, P., Escobar, C. (2020). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by filamentous Fungi Inducrs of Resistance: Trichoderma, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. Frontiers in Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2020.00992.

Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R.L., Herrera-Esttrella, A. (2011). Identification of mycoparasitism-related genes in Trichoderma atroviride. Applied Environmental Microbiology. 77, 4361-4370.

Shafawati, S., Siddiquee, S. (2013). Composting of oil palm fibres and Trichoderma spp. as the biological control agent: A review. International Biodeterioration & Biodegradation. 85, 243-253.

Sokol, N., Slessarev, E., Marschman, G., et al. (2022). Life and death in the soil microbiome: how ecological processes influence biogeochemistry. A review. Nature Review Microbiology. 20, 417-430.

Tariq, M., Khan, A., Sif, M., et al. (2020). Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B. Soil & Plant Science. DOI: 10.1080/09064710.2020.1784262.



Capítulo 3

CICLO DEL CARBONO
TRANSFORMACIÓN DE POLÍMEROS DE ORIGEN NATURAL



Capítulo 3

CICLO DEL CARBONO
TRANSFORMACIÓN DE POLÍMEROS DE ORIGEN NATURAL

3.1. Introducción

3.1.1. Formas de carbono en el ambiente: Suelo, agua y aire (importancia para el ecosistema)

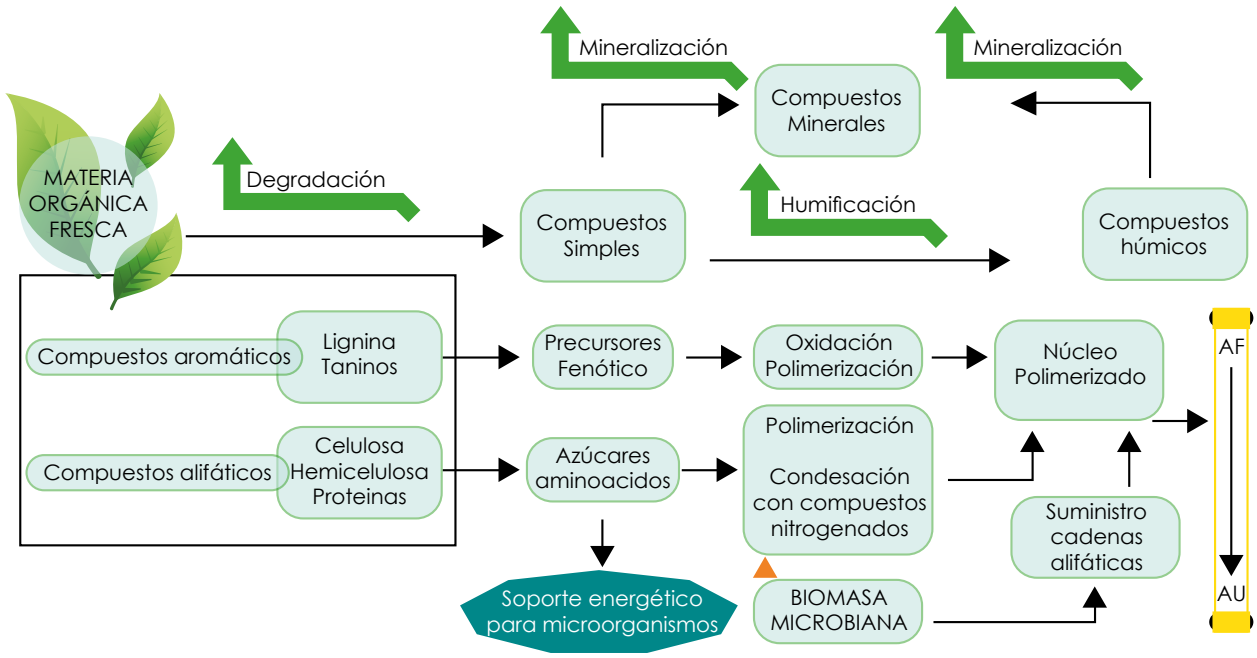
El carbono es el elemento esencial de la vida, constituye aproximadamente el 50 % de todos los organismos vivos y está presente en todos los ecosistemas (Piao et al., 2019). De manera general la transformación del carbono en la naturaleza involucra dos procesos principales: La fotosíntesis que es la conversión de la forma más oxidada del carbono (CO_2) a formas reducidas para la producción de nuevos componentes celulares en los diferentes organimos vivos (Ryu et al., 2019). Este proceso es realizado por las plantas, algas y algunos microorganismos fotoautotróficos (Enamala et al., 2020; Céspedes et al., 2021; Piao et al., 2019). A través del proceso de fotosíntesis se remueve cerca del 29 % de las emisiones de CO_2, representando aproximadamente 1,6 x 10^{10} Toneladas de este gas fijado anualmente por los organismos (Ryu et al., 2019). Constituyéndose en el proceso biológico más importante en la naturaleza para disminuir las emisiones gaseosas producidas de forma natural y antropogénica, las cuales se han incrementado sustancialmente por el desarrollo industrial y crecimiento de la población mundial (Campbell et al., 2017; Gougoulias et al., 2014).

El segundo proceso se relaciona con la liberación a la atmósfera de CO_2 y CH_4, que se logra a través de la mineralización de la materia orgánica mediado por microorganismos heterotróficos, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Bhattacharya et al., 2016; Gougoulias et al., 2014; Rao and Mohanty,

2019). Los organismos heterotróficos emplean el carbono orgánico para síntesis de nuevos componentes celulares y la obtención de energía. Durante este proceso se produce nuevamente CO_2 que es liberado a la atmósfera, cerrando así el ciclo del Carbono (Bhattacharya et al., 2016).

En el suelo, la materia orgánica que contiene carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y otros elementos, esta formada materiales o residuos de origen animal, vegetal y microbiano, frescos o con diferentes grados de biotransformación. Estos materiales se transforman o mineralizan bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, produciendo intermediarios que son utilizados como fuentes de carbono por diversos microorganismos y una fracción de estos intermediarios se convierten en los precursores para la formación de las sustancias húmicas del suelo (Ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas), (Wall et al., 2019; Rao and Mohanty, 2019). En la figura 4 se presenta de forma general cómo se realiza la transformación de la materia orgánica en suelo, hasta llegar a la formación de la reserva de carbono en suelo (sustancias húmicas). Por otro lado, parte de la materia orgánica transformada puede convertirse en materiales fósiles (petróleo o carbón), bajo condiciones reducidas de oxígeno, elevada presión y a través de millones de años (Li et al., 2022; Stepanova et al., 2022).

Figura 4.
Transformación de la materia orgánica en suelo asociado con el proceso de humificación aeróbica y anaeróbica.



Cortesía de Lucas David Pedroza Camacho.

> En el suelo, la materia orgánica que contiene carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y otros elementos, esta formada materiales o residuos de origen animal, vegetal y microbiano, frescos o con diferentes grados de biotransformación.



3.1.2. Mineralización aeróbica de la materia orgánica. Humificación directa

La materia orgánica del suelo hace referencia a la totalidad de compuestos orgánicos presentes en el mismo que proviene de los residuos de plantas, animales y microorganismos, con diferentes estados de transformación (Xu et al., 2020). Estos compuestos son transformados en función del tiempo, por la acción de factores físicos, químicos y biológicos (Wall et al., 2019). Este proceso se conoce como la degradación de la materia orgánica o proceso de humificación, que se sub divide en directa e indirecta. El proceso inicia con la fragmentación mecánica de los residuos vegetales o animales, la cual es realizada por la mesofauna edáfica del suelo y tiene como objetivo disminuir el tamaño de partícula para facilitar la biodisponibilidad para los microorganismos. Adicionalmente, la materia orgánica puede sufrir un pre tratamiento bioquímico mediado por hidrolasas y ácidos producidos por estos organismos (Socarras, 2013; Lefèvre et al., 2017; Morales-Rojas et al., 2021).

Una vez se ha disminuido el tamaño de los residuos, se inicia el proceso de hidrólisis o también llamada humificación directa la cual es realizada por diferentes comunidades de microorganismos propios del suelo que producen enzimas extracelulares que hidrolizan los polímeros para dejar intermediarios de bajo peso molecular que puedan ser transportados al interior de las células y ser empleados como fuentes de carbono y energía (Wall et al., 2019). En la tabla 1 se presentan las principales enzimas que pueden participar en el proceso de humificación directa de la materia orgánica en suelo. Estas actividades enzimáticas pueden observarse in vitro al cultivar los microorganismos en medios sólidos que contengan los sustratos inductores (Figura 5). A partir de la humificación directa se producen intermediarios que son asimilados por los microorganismos para la obtención de carbono y energía, para liberar nuevamente el carbono como CO_2 a la atmósfera (Rashad et al., 2022). Por otro lado, parte de los intermediarios que no son asimilados, quedan en el suelo y se convierten en los precursores para la formación de las sustancias húmicas a través del proceso de humificación indirecta (Moreno et al., 2019; Tadini et al., 2022).

Tabla 1.
Enzimas que participan en la mineralización y/o humificación directa de la materia orgánica en suelo

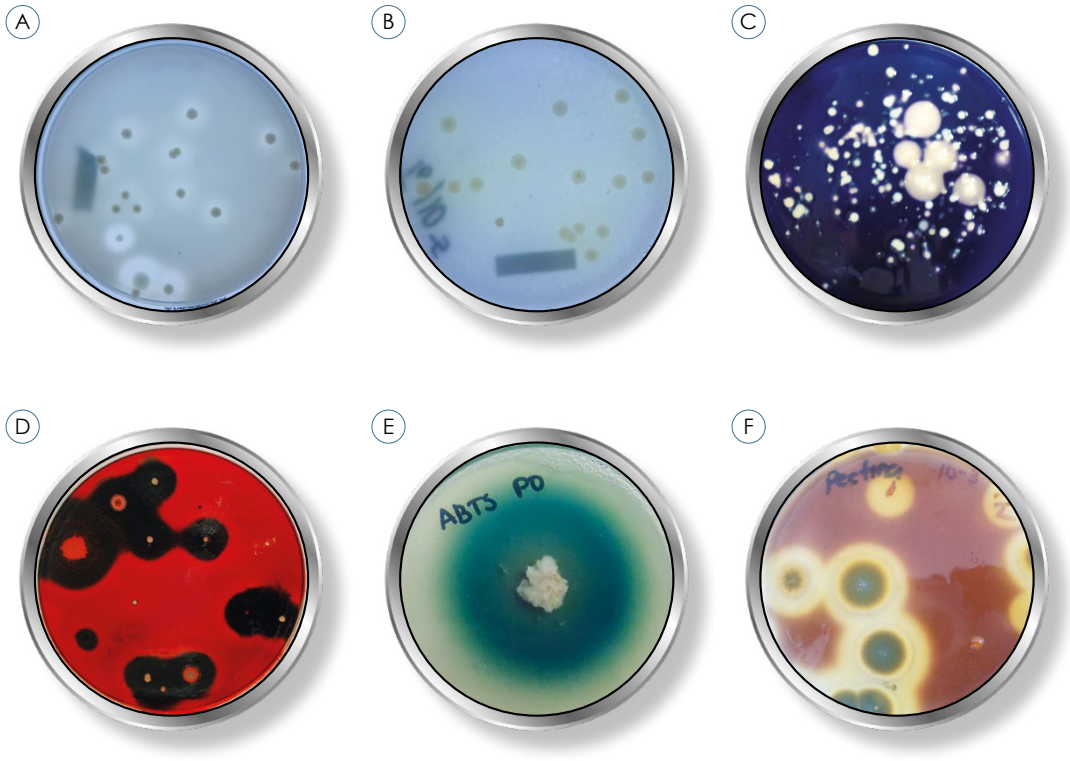
Compuesto o polímero	Función biológica	Composición química	Enzimas	Bacterias productores	Hongos productores	Referencia
Proteínas	Moléculas orgánicas que forma parte de las estructuras celulares y tienen diferentes funciones biológicas. Estructural Catalítica Regulación Defensa Transporte	Diferentes tipos de aminoácidos y otros elementos en menor proporción como azufre, fósforo, cobre, hierro, magnesio, etc. Los aminoácidos se unen entre sí a través de enlaces peptídicos entre el grupo amino y carboxilo de dos aminoácidos.	Proteasas ácidas Proteasas neutras Proteasas alcalinas. Aminopetidasas (E.C.3.4.11) Dipetidasas (E.C.3.4.13) Tripeptilpeptidasas (E.C.3.4.14.-) Serina carboxipeptidasa (E.C.3.4.16) Cisteína carboxipeptidasa (E.C.3.4.18) Aspartico peptidasa (E.C.3.4.23) Metalocarboxipeptidasas (E.C.3.4.24)	*Bacillus subtilis* *Bacillus circulans* *Bacillus cereus* *Bacillus licheniformis* *Brevibacterium sp.* *Thermus termophilus* *Stretomyces sp.*	*Aspergillus fumigatus* *Aspegillus niger* *Aspergillus flavus* *Trichoderma sp.*	Naeem et al., 2022
Lípidos	Moléculas orgánicas que actúan como compuestos de reserva energética y forman parte de las membranas celulares.	Grupo de moléculas biológicas compuestas por carbono, hidrógeno y otros elementos. Unidos a través de enlaces carbono-hidrógeno y enlaces éster.	Lipasas o triacil glicerol hidrolasas (E.C. 3.1.1.3) Esterasas	*Pseudomonas flurescens* *Serratia sp.* *Alcaligenes sp.* *Burkholderia sp.* *Bacillus coagulans* *B. thermoleovorans*	*Penicillium sp.* *Penicillium expansum* *Aspergillus niger* *Candida lipolytica* *Colletotrichum gloesporioides*	Chandra et al., 2020
Fósforo orgánico	Compuestos presentes en la materia orgánica que tiene en su estructura fósforo. Forman parte las membranas celulares, ATP, entre otros.	Compuestos ricos en carbono, nitrógeno y fósforo, unidos por enlaces éster. Pueden estar presentes como gránulos de inclusión de fósforo en estructuras como gránulos.	Fosfatasas ácidas Fosfatasas alcalinas Fosfo monoesterasas (EC 3.1.3) Fosfo diesterasas (EC 3.1.4)	*Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas sp.* *Serratia sp.* *Kosakonia sp.* *Bacillus magaterium var. phosphaticum* *Streptomyces sp.*	*Penicillium sp.* *Aspergillus sp.*	Blanco et al., 2021
Quitina	Polímero estructural y de protección en crustáceos, insectos y hongos.	Sub unidades de N-acetil glucosamina (β 1.4- acetamida-D-glucosa) unidas por enlaces glicosídicos β 1-4	Endoquitinasas (EC 3.2.1.14) Quitobiasa (EC 3.2.1.29) N-acatilglucosaminidasa (EC 3.2.1.30) N-acetylglucosaminidasa	*Bacillus sp.* *Bacillus thuringiensis* *Serratia marcescens* *Paenibacillus sp.* *Salinivibrio sp* *Streptomyces sp.*	*Beauveria bassiana* *Trichoderma harzianum* *Metarhizium anisopliae*	Satoque et al., 2007

Tabla 1.
Enzimas que participan en la mineralización y/o humificación directa de la materia orgánica en suelo

Compuesto o polímero	Función biológica	Composición química	Enzimas	Bacterias productores	Hongos productores	Referencia
Almidón	Polímero de reserva en plantas	Sub unidades de glucosa unidas por enlaces glicosidicos a 1-4, a 1-6 y β 1-4.	Endoamilasas a-amilasas (EC 3.2.1.1) Exoamilasas Glucoamilasa (EC 3.2.1.3) β-amilasas (EC 3.2.1.2) Amilasa maltogénica Amilasa productora de maltotetralosa Pululanasa o isoamilasa	*Bacillus licheniformis* *Bacillus amyloliquefaciens* Streptomyces sp.	Trichoderma sp. Penicillum sp. Aspergillus sp.	
Pectina	Polímero estructural y de protección para frutos y flores	Sub unidades de ácido galacturónico con diferentes grados de metilación unidos por enlaces β 1-4	Pectin liasa (4.2.2.10) Poligalacturonidasa (EC. 3.2.1.15) Pectin esterasa (3.1.1.11)	*Bacillus sp.* *Klebsiella sp.* *Pseudomonas sp.*	*Aspergillus niger* *Penicillium sp.* *Rhizopus sp.* *Rhizomucor sp.* *Trichoderma sp.*	
Celulosa	Polímero estructural y de protección en plantas.	Sub unidades de glucosa unidas por enlaces β 1-4	Endo β-1,4 glucanasa (E.C. 3.2.1.4) Exo β-1,4 celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91) Exo β-1,4 celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91)	*Bacillus cereus* *Leifsonia xyli* *Bacillus sp.* *Streptomycess fumigatiscleroticus* *Clostridium cellulolyticum*	*Trichoderma reseii* *Trichoderma hamatum*	Moreno et al., 2019; Seidl et al., 2016
Hemicelulosa	Polímero estructural de protección en plantas	Sub unidades de hexosas (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa) Subunidades de pentosas (D-xilosa, L-arabinosa) Los azúcares están unidos entre sí por enlaces β-1,4 y β-1,3-glucosídicos	Endo-β-1,4-xilanasa (EC 3.2.1.8) β-xilosidasa (EC 3.2.1.37) a Larabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) a-glucuronidasa (EC 3.2.1.131) Acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.72)	*Bacillus cereus* *Leifsonia xyli* *Bacillus sp.* *Streptomycess fumigatiscleroticus*	*Trichoderma reseii* *Trichoderma hamatum* *Absidia sp.* *Aspergillus sp.*	Gómez et al., 2018
Lignina	Polímero estructural de protección en plantas	Sub unidades aromáticas de fenil propano unidos por enlaces carbono-carbono, éter y aril carbono	Lacasas (EC 1.10.3.2) Manganeso Peroxidasa (EC 1.11.1.13) Lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14)	*Pleurotus ostreatus, Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor, Ganoderma lucidu, Letinula edodes, Phebia radiata*		Datta et al., 2017; Janusz et al., 2017; Madadi et al., 2017; Rivera et al., 2013

Figura 5.

Hidrólisis de polímeros in vitro asociada con procesos de humificación directa. (A) Microorganismos productores de proteasas en agar leche. (B) Microorganismos productores de lipasas en agar tributirina. (C) Microrganismos productores de amilasas en agar almidón. (D) Microorganismos productores de celulasas en agar celulosa. (E) Microorganismos productores de lacasa en agar extracto salvado de trigo con ABTS. (F) Microorganismos productores de pectinasas en agar pectina.



Cortesia de Aura Marina Pedroza y Viviana Gutierrez Romero

3.1.3. Humificación indirecta producción de sustancias húmicas. Grado de condensación de la materia orgánica

La materia orgánica del suelo (SOM) es un sistema complejo compuesto por diferentes fracciones de C (aunque también contiene N, P, K y otros elementos). Las fracciones carbonadas presentan diferente labilidad y, por ende, según las propiedades químicas y físicas de los materiales orgánicos, los productos de la degradación microbiana y mineralización de la materia orgánica son también difierentes, dependiendo además de las condiciones ambientales y el tiempo (Reddy et al., 2014; Moreno et al., 2019; Tadini et al., 2022). Las diferentes fracciones de la materia orgánica en el suelo, tanto en cantidad como en calidad, son la base de la calidad y salud del suelo y por lo tanto son los indicadores más confiables para monitorear su estado de conservación (Ortega y Martinez, 2020; Rao et al., 2019). Posterior a la mineralización se inicia el proceso de humificación indirecta, donde se polimerizan residuos de C, y se estabilizan químicamente en ácidos húmicos y fúlvicos. La estabilización de C en el suelo se debe principalmente a: i) a las reacciones de polimerización de compuestos carbonados; ii) protección física y iii) asociaciones órgano-minerales, especialmente las relacionadas con silicatos de arcilla y óxidos de hierro (Moreno et al., 2019; Reddy et al., 2014; Yang et al., 2021).

Dentro de la composición de la materia orgánica se encuentran las sustancias húmicas que corresponden a la mayor fracción (85 %) de ésta, y tienen una influencia directa sobre la

fertilidad de los suelos ya que regulan algunos procesos como: solubilidad y disponibilidad de nutrientes para la planta, fuente de energía y carbono para la comunidad microbiana, capacidad de retención de agua, entre otros (Fincheira et al., 2016; Carlderín-García et al., 2019; Rashad et al., 2022). Las sustancias húmicas se diferencian por su capacidad de extracción-precipitación en soluciones alcalinas/ácidas formando tres fracciones: AH (ácidos húmicos), AF (ácidos fúlvicos) y huminas, éstas últimas insolubles tanto en condiciones ácidas como alcalinas (Nardi et al., 2021; Rashad et al., 2022). En cualquier ecosistema, el estado y la composición de estas sustancias están dados por el manejo del suelo, clima, biota, topografía y tiempo de formación (Carlderín-García et al., 2019; Rashad et al., 2022).

De esta manera, la caracterización y funcionalidad de las sustancias húmicas puede inferir sobre el estado y calidad de la materia orgánica en el suelo, por lo que metodologías como la densidad óptica de soluciones acuosas de ácidos húmicos y fúlvicos a 465 nm y 665 nm (relación E_4/E_6) han sido ampliamente usadas por los científicos para establecer el contenido de grupos carboxílicos, el porcentaje en el contenido de carbono y oxigeno, y la media del peso molecular de las sustancias húmicas (Reddy et al., 2014; Moreno et al., 2019; Castillo et al., 2021). La absorbancia a 665 nm está relacionada con la etapa inicial de degradación de la materia orgánica, mientras que la absorbancia a 465 nm se puede atribuir a la presencia de estructuras con alto contenido de humificación (Martínez et al., 2013). Es así, como el aumento en el grado de humificación, la condensación de las estructuras aromáticas y la "edad" de la materia orgánica se verán reflejados en un aumento del coeficiente E4/E6. Finalmente, es importante mencionar que éstos valores estarán relacionados con: a) tamaño de partícula; b) pH; c) concentración de radicales libres, contenido de C, O, CO_2H y la acidez total y es d) independiente de la concentración de ácidos húmicos y fúlvicos. Por esta razón, los valores para la longitud de onda 465 nm serán mayores que los obtenidos a 665 nm debido a la presencia mayoritaria de compuestos de bajo peso molecular y menos polimerizados, valores que son reportados en suelos agrícolas y materiales orgánicos en proceso de degradación (Castillo et al., 2021).

3.1.4. Biotransformación o mineralización anaeróbica de la materia orgánica.

La digestión anaeróbica es un proceso a través del cual se lleva a cabo la mineralización de compuestos orgánicos en ausencia de oxigeno liberando productos como metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2), los cuales pueden ser utilizados para generar electricidad o calor. El proceso de digestión anaeróbica tiene grandes ventajas frente a otras tecnologías ya que trabaja con consorcios microbianos con actividad metabólica diferente, lo cual genera la eficiencia en la degradación de materiales orgánicos (Kong et al., 2019). Este proceso inicia con bacterias hidrolíticas que rompen moléculas de gran peso molecular para hacerlas disponibles como fuente de energía para los microorganismos, posteriormente, bacterias acidogénicas convierten amino azúcares en CO_2, H^+, NH_4+ y ácidos orgánicos, que van a ser sustratos para microorganismos acetogénicos y metanogénicos que liberan como productos finales metano y dióxido de carbono (Kong et al., 2019).

Además de la liberación de productos combustibles, se generan productos orgánicos que pueden ser utilizados a nivel agrícola como lodos sólidos, bio productos líquidos, entre otros, que contienen un alto nivel nutricional y pueden ser aprovechados en granjas sostenibles generando un menor impacto a nivel ambiental, ya que no hay generación de residuos, sino que son recirculados al sistema productivo de las fincas.

> "La caracterización y funcionalidad de las sustancias húmicas puede inferir sobre el estado y calidad de la materia orgánica en el suelo"

3.2. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar in vitro el proceso de transformación de la materia orgánica (polímeros) y su relación con las etapas de humificación directa e indirecta, como indicadores de calidad de suelo.

Objetivos específicos

- Evaluar semi cuantitativamente las actividades enzimáticas asociadas con la hidrólisis de proteínas, lípidos, almidón, pectina, celulosa y lignina, como indicadores de calidad en suelos y materiales orgánicos.

- Estimar el grado de condensación de carbono como componente en la formación de sustancias húmicas en diferentes materiales orgánicos.

3.3. Materiales, reactivos y medios

3.3.1. Actividades enzimáticas semi cuantitativas

- 100 g de suelo o material orgánico.

- 1 caja de Petri con agar salvado de trigo sembrada con un hongo de podredumbre blanca. (anexo A, numeral 9).

- 5 cajas de Petri con agar leche al 1% (m/v), (anexo A, numeral 4).

- 5 cajas de Petri con agar tributirina (anexo A, numeral 5).

- 5 cajas de Petri con agar almidón al 1% (m/v), (anexo A, numeral 6).

- 5 cajas de Petri con agar pectina al 1% (m/v), (anexo A, numeral 7).

- 5 cajas de Petri con agar celulosa al 1% (m/v), (anexo A, numeral 8).

- 1 caja de Petri con agar salvado de trigo con sal de diamonio 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), (ABTS) 0,5 M (anexo A, numeral 9).

- 1 caja de Petri con agar salvado de trigo con $MnCl_2$ 0,5 M (Anexo A, numeral 10).

- 1 caja de Petri pequeñas con agar lignina I (anexo A, numeral 11).

- 1 caja de Petri pequeñas con agar lignina II (anexo A, numeral 12).

- 1 caja de Petri pequeñas con agar lignina III (anexo A, numeral 13).

- 1 caja de Petri grande con agar agua suplementado con glucosa y extracto de lavadura (anexo A, numeral 14).

- 1 frasco Schott de 250 mL con 90 mL de agua peptonada al 0,1 % (m/v), (anexo B, numeral 2).

- 6 tubos de 16x150 mm tapa rosca con agua peptonada al 0,1 % (m/v).

- Puntas para pipeta de 100-1000 µL.

- Pipeta automática de 100-1000 µL.

- 5 rastrillos.

- Pipeta Pasteur de vidrio.

- Laminas portaobjeto.

- Laminillas.

- Bisturí.

- Agujas de disección.

- Lugol de Gram.

- Colorante rojo congo 1 % (m/v), (anexo B, numeral 3).

- Cloruro de sodio (NaCl) 2 M, (anexo B, numeral 4).

3.3.2. Grado de condensación o formación de sustancias húmicas

- 100 g de suelo o material orgánico.

- 1 tubo Falcon de 50 mL.

- Hidróxido de potasio (KOH) 0,5 M (anexo B, numeral 5).

- Agua destilada.

3.4. Equipos

- Incubadora.
- Balanza digital.
- Microscopio óptico.
- Espectrofotómetro UV/VIS.
- Estereoscopio.
- Centrífuga.
- Shaker o agitador horizontal.

3.5 Metodología

3.5.1.Recuento de microorganismos productores de proteasas, lipasas, amilasas, pectinasas y celulasas

- Pesar en balanza y cerca al mechero 10g de suelo.
- Depositar el suelo en el frasco Schott de 250 mL y homogenizar la preparación (dilución 10^{-1}).
- Transferir 1,0 mL del frasco Schott (dilución 10-1) a los tubos de 16x150 mm para obtener las diluciones 10^{-2} 10^{-7}.
- Marcar las cajas de agar leche, tributirina, almidón, pectina y celulosa como diluciones 10^{-3} hasta 10^{-7}.
- Sembrar 0,1 mL en superficie de las diluciones 10^{-3} a 10^{-7}.
- Distribuir homogéneamente la muestra con el rastrillo.
- Incubar a 30 ± 5°C por 48 horas.
- Realizar el recuento total de microorganismos en las cajas en las que observe colonias que oscilen entre 10 y 100 colonias.
- Realizar el recuento específico de microorganismos productores de enzimas extracelulares en las cajas en las que observe colonias que oscilen entre 10 y 100 colonias (proteasas y lipasas).
- Para el recuento de microorganismos proteolíticos no se adiciona ningún revelador, los microorganismos productores de proteasas producen un halo transparente alrededor de la colonia y el resto de la caja se observa de color blanco opaco.
- Para el recuento de microorganismos lipolíticos no se adiciona ningún revelador, los microorganismos productores de lipasas producen un halo transparente alrededor de la colonia y el resto de la caja se observa de color amarillo opaco.
- Para el recuento de microorganismos pectinolíticos adicionar a las cajas en las que realizó el recuento total 2 mL de lugol o rojo de rutenio para revelar los halos de hidrólisis y realizar el recuento específico, el cual se visualiza por la producción de una zona de aclaramiento de color amarillo claro o rojo claro alrededor de la colonia y el resto de la caja se observa de color amarillo oscuro o rojo oscuro.
- Para el recuento de microorganismos amilolíticos adicionar a las cajas en las que realizó el recuento total 2 mL de lugol para revelar los halos de hidrólisis y realizar el recuento específico, el cual se visualiza por la producción de una zona de aclaramiento de color amarillo alrededor de la colonia y el resto de la caja se observa azul oscuro.
- Para el recuento de microorganismos celulolíticos adicionar a las cajas en las que realizó el recuento total 2 mL de rojo Congo al 1 % (m/v), esperar por cinco minutos, retirar el exceso y adicionar 2 mL de NaCl 2 M. Retirar el exceso e incubar por 12 horas a 30 °C. Posteriormente, realizar el recuento específico, el cual se visualiza por la producción de una zona de aclaramiento de color amarillo alrededor de la colonia y el resto de la caja se observa de color rojo.

3.5.2. Actividad lacasa (EC. 1.10.3.2) y manganeso peroxidasas (EC. 1.11.1.13), semi cuantitativas en agar salvado de trigo con inductores

- Marcar las cajas de Petri con agar salvado de trigo con el nombre del hongo ligninolítico a evaluar.

•Destapar al pie del mechero la caja de Petri con agar salvado de trigo que tiene el hongo ligninolítico crecido previamente.

•Cortar con la pipeta Pasteur invertida un círculo de 5 mm de diámetro de agar con biomasa fúngica.

•Sembrar el disco de biomasa invertido en el centro de la caja de agar salvado de trigo que contiene los sustratos ABTS (lacasa) y $MnCl_2$ (manganeso peroxidasa).

•Incubar a 25 ± 3 °C por 8 días.

•Observar cada 2 días el crecimiento del micelio en milímetros.

•Observar cada 2 días la aparición de halos de color verde y/o morado alrededor del disco sembrado en agar salvado de trigo con ABTS el cual se relaciona con la actividad lacasa semi- cuantitativa.

•Medir el diámetro en mm del halo de color verde y/o morado.

•Observar cada 2 días la aparición de halos de color café oscuro al pie del disco sembrado en el agar salvado de trigo con $MnCl_2$ para actividad manganeso peroxidasa.

•Medir el diámetro del halo de color café como actividad manganeso peroxidasa.

3.5.3. Degradación de lignina soluble bajo tres condiciones nutricionales

•Marcar las cajas de Petri con agar lignina I, II y III, con el nombre del hongo ligninolítico a evaluar.

•Destapar al pie del mechero la caja de Petri con agar salvado de trigo que tiene el hongo ligninolítico crecido previamente.
•Cortar con la pipeta Pasteur invertida un círculo de 5 mm de diámetro de agar con biomasa fúngica invertida.

•Sembrar el disco de biomasa invertido en la parte central del agar lignina I.

•Sembrar el disco de biomasa invertido en la parte central del agar lignina II.

•Sembrar el disco de biomasa invertido en la parte central del agar lignina III.

•Incubar a 25 ± 3 °C por 8 días.

•Observar cada 2 días el crecimiento del micelio en milímetros.

•Observar cada 2 días la aparición de halos de decoloración alrededor del disco sembrado, que se relacionan con la degradación de lignina, por la acción de las enzimas ligninolíticas que oxidan los grupos cromóforos de la lignina.

•Observar cada 2 días la aparición de halos de color amarillo o café alrededor del disco inoculado que se relacionan con la producción de melaninas.

•Medir el diámetro de los halos de decoloración en los medios lignina I, II y III.

•Convertir los milímetros de decoloración a porcentaje de decoloración empleando la ecuación 10.

$$Decoloración\ (\%) = \frac{Xmm*100}{50mm}$$

(Ecuación 10)

3.5.4.Determinación del grado de condensación y/o humificación

- Pesar 4 g de la biomasa lignocelulósica, suelo, aserrín o corteza.
- Colocarlos en tubos Falcon de 50 mL con 40 mL de KOH 0,5 M.
- Extraer las sustancias húmicas totales por 24 horas con una agitación de 150 rpm a 19 °C.
- Centrifugar a 8000 rpm por 15 min y recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.
- Leer la absorbancia del sobrenadante a 465 nm y 665 nm, empleando como blanco agua destilada.
- Si la absorbancia supera el valor de 1,0, realizar una dilución con agua destilada.
- Registrar los valores y calcular la relación E4/ E6, dividendo los dos valores de absorbancia.

3.6. Referencias

Bhattacharya et al., 2016.

Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, LM., Sánchez-Castro, N., Herrera-Carlosama, L., Poutou-Piñales, RA., Díaz-Ariza, LA., Gutiérrez-Romero, EV., Rivera-Hoyos, CM., Ardila-Leal, LD., Pedroza-Rodríguez, AM. (2021). Bio-inoculant Production Composed by Pseudomonas sp., Serratia sp., and Kosakonia sp.: Preliminary effect on Allium cepa L. growth at Plot Scale. Universitas Sceitierum.

Calderín, A., van Tol de Castro, T., Santos L., et al. (2019). Structure-Property Function Relationship pf humic substance in modulating the root Growth of Plants: A review. Journal of Environmental Quallity. doi:10.2134/jeq2019.01.0027.

Cambell, J., Berry, J., Seibt, U., Smith, S., Montzka, S., Launois, T., Belviso, S., Bopp, L., Laine, M. (2017). Large historical growth in global terrestrial gross primary production. Nature. 544, 84-88.

Castillo, A., Matus, J.F., Céspedes N., et al. (2021). Evaluation of two microcosm systems for co-treatment of LDPEoxo ang lignocellulosic biomass for biochar production. Biomaterials Research. https://doi.org/10.1186/s40824-021-00222-w.

Céspedes-Bernal, DN., Mateus-Maldonado, JF., Rengel-Bustamante, JA., Quintero-Duque, MC., Rivera-Hoyos, CM., Poutou-Piñales, RA., Díaz-Ariza, LA., Castillo-Carvajal, LC., Páez-Morales, AI., Pedroza-Rodríguez, AM. (2021) Non-domestic wastewater treatment with fungal/bacterial consortium followed by Chlorella sp., and thermal conversion of the generated sludge. 3 Biotech. 11, 227. https://doi.org/10.1007/s13205-021-02780-1.

Chandra, P., Singh, E., Arora P. (2020). Microbial Lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microbial Cells Factories. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8.

Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M. (1977). Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. Soil Science Society of American Journal. 41 (2), 352-358.

Datta, R., Kelkar, A., Baraniya, D., Molaei, A., Moulick, A., Meena, R. y Formanek, P. (2017). Enzymatic degradation of lignin in soil: a review. Sustainability. 9(7), 1163.

Enamala, M., Dixit, R., Tangellapally, A., et al. (2020). Photosynthetic microorganisms (algae) mediated bioelectricity generation fuel cell: Conceise Review. Environmental Technology & Innovation. https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100959.

Fincheira-Robles, P., Martínez-Salgado, MM., Ortega-Blu, R., Janssens, M. (2016). Compost and humic substance effects on soil parameters of Vitis vinifera L cv Thompson seedless. Scientia Agropecuaria, 7(3), 291-296.

Gómez, D. (2018). Transformación física, química y microbiológica de polietileno de baja densidad (PEBD) empleando plasma de Oxígeno, fotocatálisis TiO2/UV y Pleurotus ostreatus. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. 1-166.

Gougoulias et al., 2014

Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świderska-Burek, U., Jarosz-Wilkołazka, A., Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. FEMS Microbiology Reviews. 41(6), 941-962.

Kong et al., 2019.

Lefèvre, C., Rekik, F., Alcantara, V., Wiese, L. (2017). Soil organic carbon: the hidden potential. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Li, Li., Huang, J., Chen, L., Faisal, S., Abomohra, A. (2022). Evaluation of crude bio-oil production from green tea waste through pyrolysis over clamshell waste as a natural catalyst. Sustainable Energy Technologies and Assessments. https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102453.

Madadi, M., Abbas, A. (2017). Lignin degradation by fungal pretreatment: a review. Journal Plant Pathology Microbiology. 8(2), 1-6.

Martínez. M., Gutiérrez, V., Pedroza, A. (2013) Métodos Microbiológicos, físicos y químicos

con aplicación ambiental. Manual de Microbiología. Chile: Editorial Universidad Federico Lleras San María 132 p. p.

Morales, E., Chávez, S., Hurtado, R., Milla, M., et al., (2021). Edaphic macrofauna associated with the cultivation of maize. Journal of the Selva Andina Biosphere. 9 (1): 15-25.

Moreno, D., Gómez, D., Blanco, A., Castillo, A., Herrera, L., Poutou, R., Pedroza, A. (2019). Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by Pleurotus ostreatus for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. PloS One. 14(5).

Naeem, M., Manzoor, S., Abid, M., et al. (2022). Fungal Proteases as Emerging Biocatalyst to meet the current challenges and Recent Developments in Biomedical Therapies: An Updated Reivew. Jounral of Fungi. https://doi.org/10.3390/jof8020109.
Nardi, S., Schiavon, M., Francioso, O. (2021). Chemical Structure anf Biological activity pf Humic substances define their role as Plant Growth Promoters. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules26082256.

Ortega, R., Martinez, M. (2020). Mejorar la calidad de suelos: una estrategia de adaptación al cambio climático. Mundoagro.
Piao, S., Zhang, X., Chen A., et al. (2019). The impacts of climate extremes on the terrestrial carbon cycle: A review. Earth Science. https://doi.org/10.1007/s11430-018-9363-5.

Rao, D.L.N., Aparna, K., Mohanty, S.R. (2019). Microbiology and Biochemistry of soil Organic Matter, Carbon Sequestration and Soil Health. Indian Journal and Fertiliser. 15(2): 124-138.

Rashad, M., Hafez, M., Popov A. (2022). Humic substances composition and properties as an environmentally sustainable system: A review and way forward to soil conservation. Jounal of Plant Nutrition. https://doi.org/10.1080/01904167.2021.2005801.

Ryu, Y., Berry, J., Baldocchi, D. (2019). What is global photosynthesis? History, uncertainties and opportunities. Remote Sensing and Environmental. https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.01.016.

Reddy, S., Nagaraja, S., Raj, P., Patil, P., Dumgond, P., (2014). Elemental analisys, E4/E6 ratio and total acidity of soil humic and fulvic acids from different land use systems. Annals of Plant and Soil Research. 16, 89-92.

Rivera, C., Morales, D., Poutou, R., Pedroza, A., Rodríguez, R., Delgado, J. (2013). Review. Fungal laccases. Fungal Biology Review. 27, 67-82.

Sastoque, L., Mercado, M., Martínez, M., Quevedo, B., Pedroza, A. (2007). Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de Streptomyces sp. aislada de residuos de camarón. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 6(2), 137-146.

Seidl, R., Goulart, A. (2016). Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry. 2, 48-53.

Socarrás, A. (2013). Soil mesofauna: biological indicator of soil quality. Pastos y Forrajes. 36(1), 14-21.

Stepanova, A., Gladkov, E., Osipova, E., et al. (2022). Review. Biorremediation of Soil from Petroleum Contamination. Process. https://doi.org/10.3390/pr10061224.

Tadini, A., Nicolodelli, G., Hajjoul, H., et al. (2022). Humic Fractions from Amazonic soil: Lifetime study and humifaction process by fluorescence Spectroscopy. Applied Biochemistry. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2022.105486.

Xu, P., Liu Y., Shi, L., Fu, Q., Chen, J., Hu, H., Huang Q. Influence mechanisms of long-term fertilizations on the mineralization of organic matter in Ultisol. (2020). Soil and Tillage Research. 201. 104594

Yang, F., Tang, Ch., Antonietti, M. (2021). Natural and Artificial humic substances to manage minerals, ions, water, and soil microorganism. Chemistry Society Rev. DOI: 10.1039/d0cs01363c.
Wall et al., 2019;



Capítulo 4

CICLO DEL CARBONO
TRANSFORMACIÓN DE HIDROCARBUROS Y PLÁSTICOS



Capítulo 4

CICLO DEL CARBONO TRANSFORMACIÓN DE HIDROCARBUROS Y PLÁSTICOS

Aura Marina Pedroza Rodríguez, Luis David Gómez Méndez

4.1. Introducción

El uso de combustibles fósiles como carbón o derivados del petróleo permitió la industrialización y grandes avances en transporte, energía, materiales, etc. Sin embargo, las consecuencias de este desarrollo acelerado se ven actualmente no solo en el cambio climático, sino también en la contaminación de aguas, suelos y acumulación de residuos de diferente grado de toxicidad (Li et al., 2020; Ossai et al., 2020).

Las fuentes de contaminación antropogénica son variadas, siendo las principales las relacionadas con las actividades industriales, el transporte y la actividad urbana. La industria es fuente de contaminación al generar residuos sólidos, efluentes y emisiones gaseosas, que contaminan el suelo, el agua y el aire. Aquí se tiene, entre las más contaminantes, a la industria petrolera y petroquímica ya que el petróleo genera contaminación en su extracción, transporte, refinación y uso (Bejarano, 2015; Jiménez et al., 2022).

4.1.1. Degradación de hidrocarburos y derivados

Los hidrocarburos son compuestos de carbono e hidrógeno derivados de la hulla y el petróleo. Se clasifican en: Lineales o alifáticos: Solventes o combustibles derivados del petróleo. Según su peso pueden ser gases: (metano, butano); líquidos (bencina, nafta, kerosene) o viscosos (aceites, lubricantes y parafinas). Derivados halogenados clorados: cloroformo, tetracloruro de carbono, cloruro de metilo. Cíclicos o aromáticos: solventes como benceno, xileno y tolueno (Varjani, 2017).

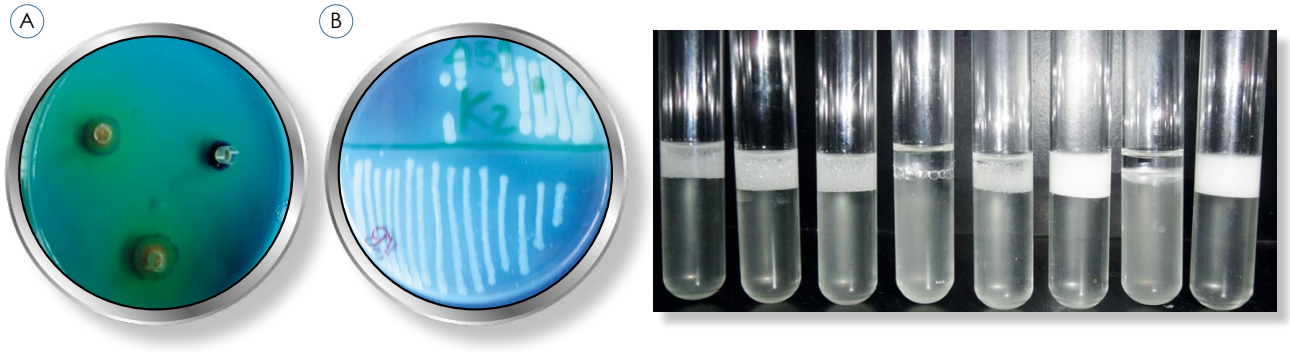
La biodegradación de hidrocarburos en suelo y agua, es un reto para la biotecnología

ambiental, principalmente porque estos compuestos tienen baja relación C/N, se requiere suplemento de nutrientes, su biodisponibilidad es baja al tener características hidrofóbicas (Li et al., 2020; Ossai et al., 2020; Anno et al., 2021) y no todos los microorganismos tienen la capacidad metabólica para biodegradarlos y emplearlos como fuente de carbono y energía (Ławniczak et al 2020). Determinando que se deban implementar diferentes biotecnologías empleando microorganismos aeróbicos y anaeróbicos solos o combinados (Anno et al., 2021). Estos tratamientos se pueden realizar in situ y ex situ, empleando tecnologías de bioaumentación y bioestimulación. En las dos están implicadas comunidades microbianas que tienen capacidad de adsorción, pueden formar biopelículas y producen diferentes tipos de enzimas como mono- di oxigenasas, citocromo, polifenol oxidasas, entre otras, para los procesos aeróbicos y reductasas en los sistemas anaeróbicos (Anno et al., 2021; Zhen et al., 2021). Por otro lado, tanto los microorganismos aeróbicos como anaeróbicos, pueden producir bajo ciertas condiciones nutricionales compuestos orgánicos extracelulares que incrementan la biodisponibilidad de los hidrocarburos y se denomina biosurfactantes (Li et al., 2020; Ossai et al., 2020).

Los biosurfactantes son moléculas de origen biológico que tienen propiedades semejantes a los detergentes o tensoactivos de origen químico. Estos compuestos se ubican en la interfase entre el agua y los compuestos insolubles en ella (hidrocarburos), reduciendo la tensión superficial y facilitando la formación de emulsiones entre el agua y el compuesto insoluble. Esta propiedad se debe a la estructura de la molécula del biosurfactante, que tiene dos zonas diferenciadas, una más afín por el agua (hidrófila) y otra poco afín por el agua (hidrófoba), por lo que se les denomina compuestos anfipáticos, como es el caso de algunos ácidos grasos, lipopolisacáridos, y fosfolípidos (Othman et al., 2022; Zahed et al., 2022). La producción de biosurfactantes ha sido utilizada exitosamente para la limpieza de los tanques de petróleo, así como para la dispersión y biodegradación de los hidrocarburos de zonas contaminadas por un derrame accidental (Sastoque et al., 2010; Othman et al., 2022; Ossai et al., 2020; Chebbi et al., 2022). A nivel de laboratorio los microorganismos productores de biosurfactantes (ramnolípidos) pueden observarse al sembrarlos en medios que induzcan la producción de estos compuestos y generen emulsificación (Figura 6), (Sastoque et al., 2010; Chebbi et al., 2022).

Figura 6.

Selección de microorganismos productores de biosurfactantes.
(A) Colonias positivas para la producción de biosurfactantes en agar Siegmund and Wagner (SW).
(B) Colonias de Pseudomonas fluorescens productoras de pigmentos fluorescentes.
(C) Pruebas de emulsificación in vitro empleando biosurfactantes y diferentes derivados del petróleo.



Cortesía de Leonardo Sastoque Cala.

4.1.2. Degradación de plásticos

La presencia de plásticos en los residuos sólidos, tanto domésticos como industriales, se ha incrementado de forma exponencial en las últimas décadas debido principalmente por ser tratados como productos de vida útil corta que son desechados rápidamente por los usuarios; se calcula que alrededor del 50 % de los plásticos que se producen en el mundo se utilizan una sola vez (los llamados plásticos de "un solo uso"); entre el 20 y el 25 % se emplean en la construcción y el resto en la fabricación de otros productos, como aparatos electrónicos, muebles y partes de vehículos (Hopewell et al., 2009; Alabi et al 2019; Gómez et al., 2021). Como la gran mayoría de los plásticos no son degradables, una vez que se desechan se acumulan en los rellenos sanitarios o botadero de basura, o son abandonados en calles y parques. Además de los problemas asociados a su manejo como residuos, los plásticos generan impactos en el ambiente debido al agotamiento de los recursos no renovables, ya que se calcula que el 4 % del petróleo y gases extraídos, se usan como materia prima para la producción de plásticos y entre el 3 y 4 % para generar la energía requerida en su manufactura (Subramanian, 2000; Alabi et al 2019).

Ante esta problemática, el manejo actual de residuos de plásticos está orientado hacia el reciclaje (Lazarevic et al., 2010; Gómez et al., 2018) y el desarrollo de alternativas biodegradables o a su biodegradación (O'Brine & Thompson, 2010). Los plásticos pueden dividirse en dos grupos: aquellos que son intrínsecamente biodegradables, cuya estructura química permite la acción directa de enzimas (como polifenol oxidasas, peroxisadas, celulasas, entre otras) y aquellos que llegan a ser biodegradables después de la acción de uno o más procesos fisicoquímicos, como hidrólisis, fotólisis o pirolisis (Ojeda et al., 2009; Moreno et al., 2019; Gómez et al., 2021).

La degradación del PE puede ser clasificada como abiótica o biótica; la primera se define como un deterioro causado por factores naturales como temperatura y radiación UV, mientras que la segunda es definida como la biodegradación causada por la participación de microorganismos que modifican y consumen el polímero generado cambios en sus propiedades (Kumar et al., 2015; Gómez, 2018). Dentro de la clasificación de la degradación abiótica está la fotodegradación y la termodegradación mientras que en la degradación biótica está la biodegradación (Gómez et al., 2021). Por su parte la oxobiodegradación involucra ambos tipos de degradación (Srikanth et al., 2022), (Tabla 2).

Tabla 2.

Diferentes rutas de la degradación de plásticos (Adaptado de http://www.envis-icpe.com, 2020)

Factores (requerimiento/ actividad)	Fotodegradación	Degradación Termo-oxidativa	Biodegradación
Agente activo	Luz UV o radiación de alta energía	Calor y oxígeno	Microorganismos
Requerimiento de calor	No requiere	Más alta que la temperatura ambiental	No requiere
Tasa de degradación	Inicialmente lenta pero su propagación es rápida.	Rápida	Moderado
Otras consideraciones	Amigable con el ambiente si no se usa radiación de alta energía	Ambientalmente no aceptable	Amigable con el ambiente
Aceptación general	Aceptable, pero costosa	No aceptable	Bajo costo y muy bien aceptada

4.2. Objetivos

Objetivos generales

- Evaluar el proceso de emulsificación de derivados del petróleo valorando la producción de biosurfactantes para aumentar la biodisponibilidad del contaminante en fase acuosa.

- Evaluar la biodegradación in vitro de láminas de polietileno de baja densidad (PEBD) tradicionales u oxobiodegradables pretratadas fisicoquímicamente, empleando hongos ligninolíticos.

Objetivos específicos

- Realizar la inducción del *biosurfactante* del tipo *ramnolípido* empleando compuestos lipídicos de bajo peso molecular.

- Evaluar la capacidad emulsificante del *biosufactante* producido por *Pseudomonas fluorescens* empleando un hidrocarburo.

- Determinar, a través de mediciones físicas y químicas, la biodegradación de láminas de PEBD por *Pleurotus ostreatus, Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor* y/o *Ganoderma lucidum*.

4.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo

4.3.1. Inducción de la producción de bio surfactantes

- 3 Erlenmeyer 250 mL con 50 mL de medio mineral inductor (anexo A, numeral 15).

- 1 caja de agar nutritivo sembrada con *Pseudomonas fluorescens* (anexo A, numeral 2).

- Asa curva.

- Agua peptonada 0,1% (m/v), (anexo B, numeral 2).

4.3.2. Prueba semi cuantitativa para producción de biosurfactantes

- 1 caja de Petri con agar *Siegmund* and Wagner (SW), (anexo A, numeral 16).

- 1 caja de Petri con agar King B (anexo A, numeral 17).

4.3.3. Pruebas de emulsificación in vitro

- 1 tubo 16x150 mm con 5 mL cultivo de *Pseudomonas fluorescens* inducido para la producción de *ramnolípidos*.

- 1 tubo 16x150 mm con 12 mL agua destilada.

- 2 tubos de 16x150 mm con 0,5 mL de gasolina o benceno.

- 1 tubo de 13x150 mm con 2 mL Triton x.

- 4 pipetas de 5 mL.

- 1 pipeta de 10 mL.

- Asa curva.

- Petróleo, gasolina o benceno.

- Agua destilada.

- Colorantes de Gram.

4.3.4. Degradación de láminas de polietileno de baja densidad (PEBD)

4.3.4.1. Pretratamiento por fotólisis de láminas de PEBD

- Nueve láminas de PEBD de (3,0 ± 0,1) cm x (1,0 ± 0,1) cm limpios, a las cuales previamente se les ha determinado peso, hidrofobicidad y grupos químicos presentes (Figura 8).

- Cámara de irradiación UV/254 nm.

- Tres cajas de Petri limpias.

4.3.4.2.Biodegradación de las láminas de PEBD pretratadas

- Una caja de Petri con agar salvado de trigo (Figura 7) crecido con el hongo de interés (anexo A, numeral 9).

- Tres Erlenmeyer de 500 mL, con 250 mL de caldo salvado de trigo suplementado con cloranfenicol 0,1 g/L (anexo A, numeral 9).

•Puntas para pipeta automática estériles.

•Asa redonda o aguja de disección.

•Tres cajas de Petri con agar Radha (anexo A, numeral 18).

•Solución salina al 0,85 % (m/v) (anexo B, numeral 1).

•1000 mL de solución de glucosa (0,625 g/L) y cloruro de amonio (0,050 g/L) (anexo B, numeral 6).

•Tres frascos de polipropileno estériles, para centrifuga.

•Espátulas o baja lenguas estériles.

4.4. Equipos

•Incubadora.

•Balanza digital.

•Microscopio.

•Shaker o agitador horizontal.

•Lámpara de mano para luz ultravioleta.

4.5. Metodología

4.5.1.Inducción de la producción de bio surfactantes

•Sembrar por aislamiento la cepa de *Pseudomonas fluorescens* en agar King B 24 h a 37 °C.

•Preparar 30 mL de una suspensión de *Pseudomonas fluorescens* en agua peptonada 0,1 % (m/v) con una contracción igual al tubo 1 del Nefelómetro de Mac Farland.

•Inocular 10 mL de la suspensión a 40 mL de medio mineral inductor para ramnolípidos.

•Incubar por 8 días 37 °C a 120 rpm.

•Realizar coloración de Gram y observar al microscopio con aumento de 100 x.

•Alicuotar 5 mL del cultivo en un tubo de 16x150 mm y refrigerar a 4 °C hasta el montaje de los ensayos de emulsificación.

4.5.2.Prueba semi cuantitativa para producción de biosurfactantes

•Sembrar por aislamiento la cepa de *Pseudomonas fluorescens* en agar nutritivo 24 h a 37 °C

•Tomar una colonia aislada de *Pseudomonas fluorescens* y sembrar por aislamiento sobre agar SW y King B.

•Incubar por 48 horas a 37 °C.

•Realizar coloración de Gram.

•Observar la formación de un pigmento de color azul alrededor de las colonias presuntivas productoras de biosurfactantes en agar SW.

•Observar la formación de halos amarillos alrededor de las colonias presuntivas productoras de biosurfactantes en agar SW.

•Observar la florescencia de las colonias en King B expuestas a la luz UV de 366 nm generada por lámparas de mano.

4.5.3. Pruebas de emulsificación in vitro

•Tomar una alicuota 0,5 mL de gasolina o benceno y colocarla en dos tubos de 16x150 mm.

•Adicionar 4 mL de agua destilada a cada tubo.

•Adicional a uno de los tubos 0,5 mL de sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas flurescens* productora de ramnolípidos.

•Adicionar 0,5 mL de Triton X al segundo tubo.

•Homogenizar la mezcla por 30 segundos empleando vortex.

•Incubar los tubos a 37°C por 48 horas.

•Observar y medir la altura del anillo de emulsificación en el tratamiento con surfactante químico y biológico.

•Calcular el porcentaje de emulsificación tomando como el 100 % la altura del anillo obtenido con el surfactante químico (Triton X).

4.5.4. Degradación de plástico

4.5.4.1. Determinación de la hidrofobicidad de láminas de PEBD (Medición del ángulo de contacto estático)

•Con ayuda de una pipeta automática (micropipeta), depositar dos gotas de 50 µL de agua desionizada (una al lado de la otra) sobre lámina PEBD. Con el uso de un teléfono celular o videocámara, capturar una imagen como se observa en la figura 7.

•Con la ayuda de un programa de análisis de imágenes (o Power Point ™) determine la altura (h) y el radio (a) de las gotas de agua empleando estas ecuaciones 11 y 12.

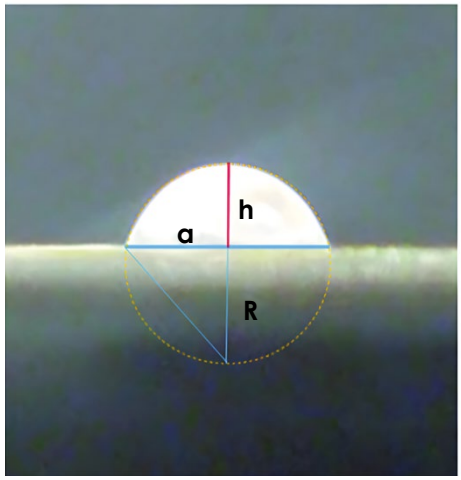
$$R = (\alpha^2 + h^2)\ /2h \qquad \text{(Ecuación 11)}$$

$$\alpha = \left(\frac{a}{R}\right) \text{ (Ecuación 12)}$$

Dónde: R es el segmento del radio de la esfera que describe la gota de agua. A manera de ejemplo:

Figura 7.
Gotas de agua desionizada sobre una lámina de PEBD. Mediciones a la gota de agua para determinar el ángulo de contacto estático





d= 3.47
a= 1.735
h= 1.29

$$R = (\alpha^2 + h^2)\ /2h = 1.83$$

$$\alpha = \sin^{-1}\left(\frac{a}{R}\right) = \sin^{-1}\left(\frac{1.735}{1.83}\right) = 71.45^\circ$$

Phywe. Plasma physics: Surface treatment

Cortesía dede Luis David Gómez.

4.5.4.2. Ensayos de biotransformación de láminas de PEBD

•Tomar, con ayuda de una punta azul estéril, entre 8 a 10 fragmentos o círculos de agar salvado de trigo con crecimiento miceliar de *Pleurotus ostreatus* y disponerlos dentro de un Erlenmeyer con caldo salvado de trigo.

•Incubar los Erlenmeyer durante 10 días, a 120 rpm y 25°C.

•Tomar la biomasa formada después de la incubación y trasvasarla a los frascos de polipropileno estériles.

•Centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos y a 4°C.

•Descartar sobrenadantes y lavar la biomasa cinco veces (cuatro veces en solución salina al 0,85 % (m/v) y la última en una solución de glucosa y cloruro de amonio); los lavados también se realizan en centrífuga bajo las mismas condiciones del punto anterior.

•Tomar las nueve láminas de PEBD limpias (libres de grasa) y colocarlas dentro de la cámara de irradiación UV (separadas, no unas sobre otras).

•Exponer las láminas durante 24 horas a fotólisis UV/254 nm (12 horas por cada lado de la lámina).

•Tomar las tres cajas de Petri con agar Radha y, con ayuda de un cortador estéril, de la aguja de disección o asa flameada, hacer tres (3) cortes en el agar, cada uno de (3 x 1) cm, en cada caja; retirar el agar cortado.

•Disponer en los rectángulos formados dentro del agar, las láminas de PEBD recién irradiadas.

•Colocar sobre las láminas de PEBD, la biomasa fúngica lavada y centrifugada.

•Incubar las cajas de Petri a 25°C, durante 8 semanas. Durante este tiempo, realizar observaciones cada 8 días del crecimiento miceliar teniendo en cuenta: crecimiento radial (mm), morfología del crecimiento miceliar, liberación o no de pigmentos difusibles.

•Retirar, después de 8 semanas, las cajas de Petri de la incubadora; con pinzas estériles, retirar las láminas de PEBD y realizar un lavado con agua tibia, para eliminar biomasa adherida.

•Secar al ambiente y determinar

•Cambio en peso.

•Cambio en hidrofobicidad.

•Modificación en grupos químicos (espectroscopia UV/Vis o IR)

4.6. Referencias

Alabi, O., Ologbonjaye, K., Awosolu, O., et al. (2019). Public and Environmental Health Effects of Plastic Wastes Disposal: A Review. Journal Toxicology and Risk Assessment. DOI: 10.23937/2572-4061.1510021.

Anno, F., Rastelli, E., Sansone, C., et al. (2021). Bacteria, FUnfi, and Microalgae, for the Bioremadiation of Marine Sediments Contaminated by Petroleum Hudrocarbons in the Omic Era. Microorganims. https://doi.org/10.3390/ microorganisms9081695.

Alabi, O., Ologbonjaye, K., Awosolu, O., et al. (2019). Public and Environmental Health Effects of Plastic Wastes Disposal: A Review. Journal Toxicology and Risk Assessment. DOI: 10.23937/2572-4061.1510021.

Bejarano, F. (2015). La contaminación química mundial. Ecologista. 38, 34-36.

Chebbi, A., Franzetti, A., Formicola, F., et al. (2022). Insights into rhamnolipid-based soil remediation technologies by safe microorganisms: A critical review. Journal of Cleaner Production. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133088.

Gómez, D. (2018). Transformación física, química y microbiológica de polietileno de baja densidad (PEBD) empleando plasma de Oxígeno, fotocatálisis TiO2/UV y Pleurotus ostreatus. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.

Gómez, D., Moreno, D., Poutou, R., Salcedo, J., Pedroza, M., Vargas, A. (2018) Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by Pleurotus ostreatus. PLoS ONE. 13(9), e0203786.

Gómez-Méndez, L., Luis C. Jiménez-Borrego, Alejandro Pérez-Flórez, Raúl A. Poutou-Piñales, Aura M. Pedroza-Rodríguez, Juan C. Salcedo-Reyes, Andrés Vargas, and Johan M. Bogoya. (2021). LDPE transformation by exposure to sequential low-pressure plasma and TiO2/UV photocatalysis. Molecules.

Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E. (2009). "Plastics recycling: challenges and opportunities," Philos. Trans. Royal Society B: Biological Sciences. vol. 364, no. 1526, pp. 2115–2126.

http://www.envis-icpe.com, 2020.

https://institutonacional.cl, 2020.

Jiménez, V., Pedroza, A.M., Ramos, O., Castillo L. (2022). Synthetic Biology: A new era in Hydrocarbon Bioremediation. Processes. https://doi.org/10.3390/pr10040712.

Kumar, S., Raut, S. (2015). Microbial degradation of low-density polyethylene (PEBD): a review. Journal of Environmental Chemical Engineering. 3 (1), 462-473.

Lazarevic. D., Aoustin, E., Buclet, N., Brandt, N. (2010). Plastic waste management in the context of a European recycling society: Comparing results and uncertainties in a life cycle perspective. Resources Conservation and Recycling. 55 (2), 246-259.

Li, Q., Liu, J., Gadd, G. (2020). Fungal biorremediation of soil co-contaminated with petroleum and heavy metals. Applied Microbiology and Biotechnology. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10854-y.

Moreno, D., Gómez, L., Blanco, A., Castillo, A., Herrera, L., Poutou, R., Salcedo, J., Díaz, L., Castillo, L., Rojas, S., Pedroza, A. (2019). Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by Pleurotus ostreatus to biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. PLOS ONE.

O'Brine, T., Thompson, R. (2010). Degradation of plastic carrier bags in the marine environment. Marine Pollution Bulletin. 60 (12), 2279-2283.

Ojeda, M., Dalmolin, E., Forte, C., Jacques, S., Bento, F. (2009). Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable polyethylenes. Polymer Degradation and Stability. 94, 965–970.

Othman, A., Ismail, N., Addullah, S., et al. (2022). Potential of indigenous biosurfactant-producing fungi from real crude oil sludge in total petroleum hydrocarbon degradation and its future research prospects. Journal of Environmental Chemical Engineering. https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107621.

Ossai, IC., Aziz, A, Hassan, A., Hamid, FS. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. Environmental Technology & Innovation. 17, 100526.

Sastoque, L., Pedroza, A., Rodríguez, R., Cotes, A. (2010). Effect of nutrients and fermentation conditions on the production of biosurfactants using rhizobacteria isolated from fique plants. Universitas Scientiarum. 15 (3), 251-264.

Srikanth, M., Sandeep, T., Sucharitha, K., et al. (2022). Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. Bioresources and Bioprocessing. https://doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4.

Subramanian, P. (2020). Plastics recycling and waste management in the US. Resource. Conservation. Recycle. 28 (3–4), 253–263.

Varjani, SJ. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology. 223, 277–286.

Zahed, M., Matinvafa, M., Azari, A., et al. (2022). Biosurfactant, a green and effective solution for bioremediation of petroleum hydrocarbons in the aquatic environment. Discover Water. https://doi.org/10.1007/s43832-022-00013-x.

Zhen, L., Hu, T., Lv, R., et al. (2021). Succesion of microbial communities and synergic effects during bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil enhacec by chemical oxidation. Journal of Hazardous Materials. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124869.



Capítulo 5

CICLO DEL NITRÓGENO



Capítulo 5

CICLO DEL NITRÓGENO

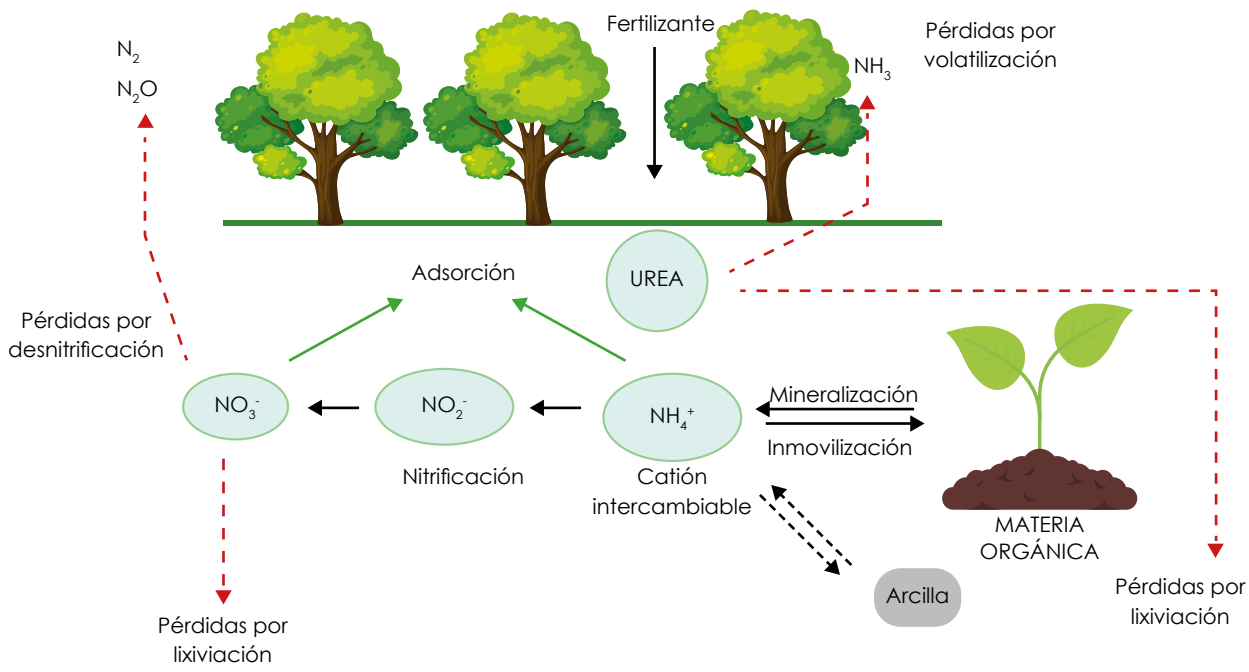
Viviana Gutiérrez Romero, Claudia Marcela Rivera Hoyos.
Lucía Ana Díaz Ariza, Rodrigo Ortega Blu

5.1. Introducción

El nitrógeno es uno de los nutrientes fuertemente limitantes para la producción de cultivos, y su uso adecuado puede dar como resultado un retorno económico sustancial para los agricultores para asegurar la producción de alimentos a nivel mundial, así como mantener la sostenibilidad y calidad de los ecosistemas. Se presenta en formas reducidas como N_2 o nitrógeno atmosférico, NH_4^+ (ion amonio), NH_2^+ (aminas), u oxidado como N_2O (óxido nitroso) importante gas de efecto invernadero, NO_2^- (nitrito) o $NO_3^=$ (nitrato). A diferencia de los microorganismos fijadores de N, las plantas no aprovechan directamente el N_2, por lo que el N debe estar en solución (NH_4^+ o $NO_3^=$) para ser aprovechado y metabolizado por las plantas. Sin embargo, cuando los aportes de N al sistema del suelo exceden las necesidades de los cultivos, existe la posibilidad que cantidades excesivas de nitrato (NO_3-N) pasen a tejidos de plantas y de ahí a los animales y el hombre causando incluso enfermedades como el "síndrome del bebé azul" en donde el O_2 de la sangre es desplazado por el $NO_3^=$, o lleguen a aguas subterráneas o superficiales (Ramm et al., 2022).

El comportamiento del nitrógeno en el sistema del suelo es complejo, pero comprender el ciclaje de este nutriente bajo diversas condiciones es esencial para un manejo más eficiente tanto de fuentes orgánicas e inorgánicas y lograr así un equilibrio entre producción sostenible y el manejo racional de este nutriente en el medio ambiente. En la figura 8 se observa el ciclo general del nitrógeno en suelo.

Figura 8.
Ciclo general del Nitrógeno en suelo.



Cortesia de Rodrigo Ortega Blu. Modificado por Lucas David Pedroza Camacho.

> La fijación biológica ocurre cuando el nitrógeno atmosférico es reducido a formas disponibles para la planta, como el amonio, gracias a la acción del complejo enzimático Nitrogenasa, presente únicamente en microorganismos procariotas.

5.1.1. Fijación de nitrógeno atmosférico

En la dinámica del N, compuestos como el nitrato y amonio son nutrientes indispensables en la nutrición vegetal, y su disponibilidad está relacionada en su gran mayoría con la aplicación de productos químicos y orgánicos y con las transformaciones que pueden ocurrir en suelo bajo diferentes condiciones bióticas y abióticas. Debido a la no reactividad del nitrógeno molecular (N_2), su entrada a la biosfera se realiza a través de su fijación con una contribución global estimada de 180 millones de toneladas métricas de amonio por año. Por esta razón, el proceso de fijación ha sido reconocido como uno de los más importantes para la sostenibilidad y productividad de los cultivos, así como de los más complejos para su estudio (Cerón & Ariztizabal, 2012; Bellenger et al., 2020).

La fijación biológica ocurre cuando el nitrógeno atmosférico es reducido a formas disponibles para la planta, como el amonio, gracias a la acción del complejo enzimático Nitrogenasa, presente únicamente en microorganismos procariotas. La enzima está codificada por los genes *nif*H, *nif*D y *nif*K (Baulikar et al., 2020). Las bacterias y archaeas diazótrofas (fijadoras de nitrógeno) pueden ser simbióticas (obligadas o asociativas) y de vida libre. En la tabla 3 se presentan algunos de los géneros asociados con este proceso.

Tabla 3.

Ejemplos de microorganismos diazótrofos simbióticos y de vida libre reportados en el suelo

Microorganismos simbióticos		Microorganismos de vida libre
Obligados	Asociativos	
Rhizobium	*Azospirillum*	*Achromobacter*
Bradyrhizoibium	*Herbaspirillum*	*Acetobacter*
Azorhizobium	*Acetobacter*	*Alcaligenes*
Sinorhizobium	*Azoarcus*	*Bacillus sp.*
Allorhizobium	*Burkholderia*	*Beijerinckia*
Frankia	*Enterobacter*	*Methanosarcina*
Anabaena	*Serratia*	*Methanococcus*
Nostoc	*Sphingomonas*	*Azotobacter*
	Pseudomonas	
	Derxia	

Estos microorganismos se encuentran en numerosos cultivos de gramíneas y leguminosas como maíz, arroz, caña de azúcar, bambú, pasto, alfalfa, soya y frijol y con otras muchas especies vegetales incluyendo forestales, ornamentales, frutales y hortalizas. Sin embargo, su actividad biológica está condicionada por diversos factores como: el tipo de suelo, la humedad, el pH, el estado fenológico del cultivo y el manejo, entre otros (Baulikar et al., 2020). Específicamente, el tipo de fertilización ejerce selectividad sobre la comunidad fijadora del suelo, y se ha reportado que el manejo orgánico proporciona condiciones ambientales favorables en el incremento de la diversidad y abundancia de filotipos, contrario a lo que sucede con la fertilización mineral. Adicionalmente, las bajas concentraciones de C y P en sistemas agrícolas pueden limitar no solo la deficiencia y absorción de nutrientes en el sistema, sino también la efectividad en los procesos de fijación de N_2 y la reducción en el tamaño de las poblaciones diazótrofas (Fan et al., 2019; Huang et al., 2019; Torabian et al., 2019: Cerón & Aristizabal, 2012).

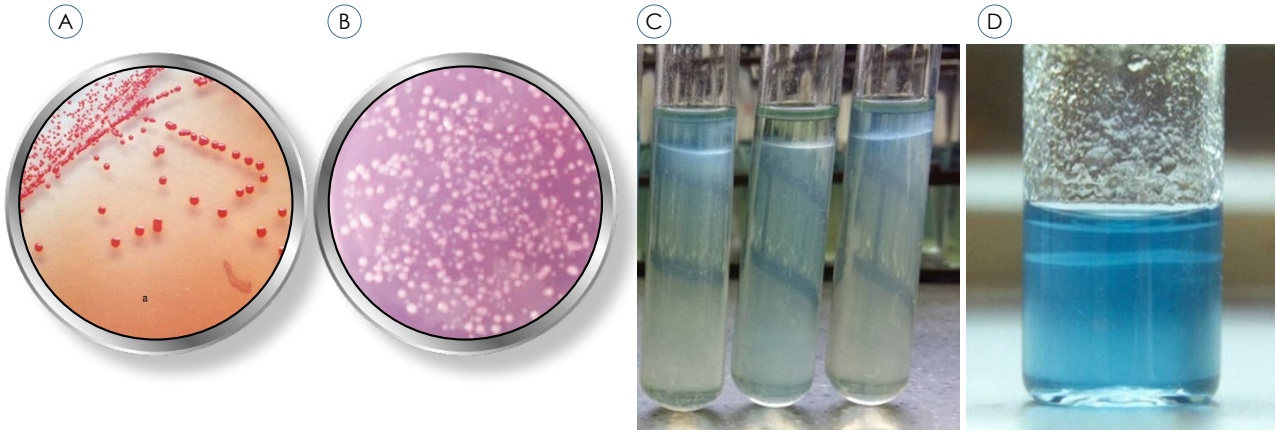
Para el análisis de estas comunidades microbianas se han implementado técnicas muy sensibles como la identificación de genes *nif*H, análisis del 16S rRNA, dilución de isótopos de nitrógeno y uso de espectros para identificación de ^{15}N, las cuales requieren equipos de alta tecnología, mano de obra calificada y reactivos de alto costo. No obstante, son utilizadas también técnicas menos precisas como el aislamiento en placa de diazótrofos, NMP de fijadores de N_2, la diferencia del N total (unidad experimental y control), balance de N en el sistema, análisis de reducción de acetileno (determinación de la actividad de la enzima nitrogenasa), modificaciones del método Kjeldhal, contenido de Leg-Hemoglobina entre otras, que pueden brindar también información relevante en la dinámica del N. Su selección dependerá exclusivamente de los objetivos planteados en la investigación (Fonseca et al., 2020).

En los estudios de microbiología clásica se incluyen los métodos de recuento y aislamiento de microorganismos diazótrofos aerobios (aislamiento en placa) o microaerofos (cultivo en medio semisólido y análisis por NMP). En la figura 9 se presentan imágenes de aislamientos, recuento y crecimiento en medio semisólidos para microorganismos fijadores de nitrógeno.

> Estos microorganismos se encuentran en numerosos cultivos de gramíneas y leguminosas como maíz, arroz, caña de azúcar, bambú, pasto, alfalfa, soya y frijol

Figura 9.

Aislamiento y recuento de microorganismos fijadores de N_2. (A) Azospirillum lipoferum en Agar Rojo Congo; (B) Rhizobium sp. en Agar YMA; (C) Prueba de NMP positiva para fijadores de N_2 microaerófilos; (D) Azospirillum lipoferum en medio semisólido NFB.



Cortesía Lucía Ana Díaz Ariza y Viviana Gutierrez Romero.

5.1.2. Oxidación y reducción de nitrógeno

El nitrógeno se encuentra presente en todos los ecosistemas, en diversos estados de oxidación como: nitrógeno molecular (N_2), nitrógeno orgánico (en plantas, animales, biomasa microbiana y materia orgánica del suelo), amonio (NH_4+) y iones de nitrato (NO_3-). De manera tradicional, el ciclo del nitrógeno desde el punto de vista de los grupos microbianos involucrados, se ha dividido en tres grandes procesos (fijación de nitrógeno, nitrificación y desnitrificación) y los microorganismos que participan en estas transformaciones se han agrupado de acuerdo a su función eco fisiológica como "fijadores de nitrógeno", "nitrificantes" y "denitrificantes" (Bellenger et al., 2020; Song et al., 2021; Han and Zhou, 2022). Sin embargo, en los últimos años, el entendimiento del ciclo se ha incrementado y se han descrito nuevas rutas que involucran procesos de asimilativos como la reducción de nitrito a óxido nítrico y óxidos nitrosos en ambientes óxicos (nitrificación denitrificante o "*nitrifier denitrification*"), la reducción de nitrito a amonio (respiración amonificante o "*respiratory ammonification*"), la oxidación de amonio en ambientes anóxicos (anammox) y, más recientemente, la oxidación completa de amonio a nitrato (comammox), (Stain & Klotz, 2016; He et al., 2022). Por lo que, actualmente, se aceptan cinco flujos de transformación del nitrógeno: Amonificación (incluye la fijación de nitrógeno y la reducción asimilativa y desasimilativa de nitrito), nitrificación, denitrificación, anammox (como una forma combinada de nitrificación y denitrificación) y la interconversión de nitrito-nitrato; terminando el ciclaje y transformaciones del nitrógeno con los procesos de mineralización (mineralización de la materia orgánica generando principalmente amonio) y asimilación de amonio (Han and Zhou, 2022).

Los microorganismos cumplen un rol fundamental en el ciclaje de este nutriente, llevando a cabo procesos de oxido-reducción a partir de las cuales, se liberan formas inorgánicas disponibles importantes para la nutrición vegetal y el desarrollo y mantención de la microbiota del suelo (Ramm et al., 2022). Como se mencionó anteriormente, además del proceso de la fijación de N, existen otros procesos como la amonificación/ inmovilización, nitrificación y denitrificación, responsables del movimiento del nitrógeno fijado de una forma a otra en suelo y agua (He et al., 2022; Han and Zhou, 2022). La amonificación, es el proceso enzimático que libera NH_3 a partir de compuestos orgánicos nitrogenados; ocurre por proteólisis y la degradación de ácidos nucleicos, urea y aminoazúcares como la quitina y N-acetilglucosamina (Song et al., 2021; Han and Zhou, 2022).

Por su parte, el proceso de nitrificación es aerobio y generalmente es considerado como un proceso de dos pasos; primero el amonio es oxidado a nitrito por la acción de bacterias Gram negativas quimioautótrofas de la familia *Nitrobacteriaceae* (Bacterias Oxidadoras de Amonio – BOA), y finalmente el nitrito es oxidado a nitrato gracias a la actividad de las Bacterias Oxidadoras de Nitrito (BON), donde se encuentran bacterias como *Nitrobacter* sp., *Nitrospira sp.* y *Nitrococcus* sp., que se ven inhibidas a pH alcalino (Soliman and Eldyasti 2018; Lu et al., 2019; Song et al., 2021). Sin embargo, recientemente se han descrito bacterias del género *Nitrospira* y algunas arqueas como microorganismos capaces de llevar a cabo la oxidación completa del amonio (comammox: *complete ammonia oxidation*) realizando de forma secuencial la oxidación de amonio y oxidación de nitrito (Van Kessel et al., 2015; Ren et al., 2020; Zhu et al., 2022), llevando a cabo procesos eficientes y relevantes en varios ecosistemas (Li et al., 2018).

Para que se lleven a cabo estos procesos, la enzima Amonio Monooxigenasa (AMO) que actúa a pH neutro, y la enzima Hidroxilamina Oxidasa (HAO), que se encuentra en el periplasma celular (Daims et al., 2015; Soliman and Eldyasti 2018; Lu et al., 2019; Song et al., 2021; Zhu et al., 2022), catalizan la oxidación del amonio a nitrito; y la enzima Nitrito Oxidasa (NO), que se encuentra en el citoplasma es la responsable de la oxidación de nitrito a nitrato (Daims et al., 2015; Soliman and Eldyasti 2018; Lu et al., 2019; Song et al., 2021).

De otra manera, la desnitrificación describe el proceso de respiración anaeróbica de nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) a nitrógeno molecular (N_2), (Martínez-Espinosa et al., 2021). Los microorganismos heterótrofos que pueden llevar a cabo estas tres reacciones de manera acoplada junto con la reducción de nitrato a nitrito son llamados denitrificantes clásicos o canónicos, ya que se sabe que tanto bacterias como archaeas expresan parcialmente las enzimas involucradas en la secuencia completa de desnitrificación. Dichas rutas incompletas pueden ser causantes de la acumulación de nitrato y de algunos gases como NO y N_2O en los ambientes (Stain & Klotz, 2016). La desnitrificación o reducción del nitrato, ocurre en pH de 6–6,5, y en temperaturas desde 2 a 65°C. Microorganismos como *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Thiobacilus denitrificans* y *Azospirillum sp.*, pueden realizar este proceso. Se puede llevar a cabo de forma asimilativa, un proceso independiente del oxígeno (cuando el nitrato es utilizado para la síntesis de compuestos orgánicos) o desasimilativa (cuando el nitrato es utilizado como aceptor final de electrones: respiración de nitrato). En el primer caso, el producto es amonio, mientras que, en el segundo, el producto es nitrógeno molecular o dióxido de nitrógeno (Shi et al., 2020). Estas transformaciones del nitrógeno pueden evidenciarse mediante la utilización de medios de cultivo que contengan sustratos para las enzimas implicadas en el proceso de nitrificación y desnitrificación (Stain & Klotz, 2016).

Finalmente, es importante tener en cuenta que la medición de estos procesos en distintas matrices se hace complejo, por lo que se han implementado diversas metodologías como la determinación de las tasas de nitrificación, estimación de la diversidad, abundancia y crecimiento de oxidadores de amonio, así como la determinación de la actividad enzimática como medida directa y sensible en cada etapa de oxidación (Martínez et al., 2013).

De manera rápida y sencilla, la detección del proceso de nitrificación -denitrificación se puede realizar mediante la prueba de color para amonio y nitrato (Martínez et al., 2013). Para la detección de NH_4^+, se utiliza el reactivo de Nessler con la liberación de un color amarillo en el medio o precipitado rojo en el caso de una prueba positiva; en el caso de una prueba negativa no hay cambio de color del medio (transparente con precipitado de sales). El reactivo actúa como una solución alcalina compuesta por yoduro de potasio y yoduro de mercurio que reacciona con los iones amonio, formando un compuesto pardo amarillento llamado yodomercurinato de potasio alcalino (Kifle & Laing, 2015).

Por su parte, el reactivo de Griess-Ilosvay es utilizado para la detección de nitrito, aunque también puede suponer la presencia de nitratos. El reactivo está compuesto de ácido sulfanílico, ácido acético y α-naftilamina. Si el Nitrato es reducido a nitrito, este reacciona con el ácido sufánilico incoloro para

convertirse en ácido sulfanílico diazotizado más agua. Posteriormente el grupo azo (-N=N) reacciona con dimetil-α-naftilamina para formar p-sulfobenceno-azo-α-naftilamina que es un colorante rosado azo soluble en agua y confirma la presencia de nitritos en la muestra analizada (Elbanna et al., 2012).

Si la reacción es negativa o incolora, se procede a adicionar polvo de Zn, el cual reduce por vía química el nitrato a nitrito confirmando que el nitrato está presente en el medio. En caso contrario, indica que el nitrato pudo seguir siendo reducido por vía asimilativa o desasimialativa.

5.2. Objetivos

Objetivos generales

- Determinar las densidades poblacionales y la actividad biológica de bacterias asociadas con el ciclaje del nitrógeno en suelos.

- Recuperar microorganismos nitrificantes y reductivos a partir de muestras de suelo o agua.

Objetivos específicos

- Aislar y cuantificar microorganismos fijadores de N atmosférico.

- Determinar cuantitativamente la liberación de productos finales dentro de las reacciones óxido-reductivas del ciclo, para confirmar la presencia de microorganismos que participan en él.

- Realizar pruebas químicas cualitativas relacionadas con las etapas oxidativas y reductivas del ciclo del nitrógeno.

5.3. Materiales, medios de cultivo y reactivos

5.3.1. Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno asociativos o simbióticos a partir de raíces de arveja, frijol, trébol, alfalfa u otra leguminosa nodulada: Rhizobium sp.

- 1 caja de Petri con agar levadura manitol (YMA), (anexo A, numeral 19).

- 1 frasco de compota con 10 mL de alcohol etílico al 20 % (v/v), (anexo B, numeral 7).

- 1 frasco de compota con 10 mL de hipoclorito 2,5% (v/v), (anexo B, numeral 8).

- 1 frasco de compota con 10 mL de agua destilada estéril.

- 1 mortero estéril.

- Pinzas.

- Colorantes de Gram.

- Aceite de inmersión.

- Bisturí.

5.3.2. Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno no asociativos: Azotobacter sp.

- 10 g de muestra de suelo.

- 1 caja de Petri con agar Ashby (anexo A, numeral 20).

- Pinzas.

- Suelo agrícola.

5.3.3. Aislamiento de microorganismos microaerofílicos de nitrógeno asociativos

- 1 g de raíces de gramíneas.

- 3 tubos de ensayo 16x150 mm, con 9 mL de solución salina 0,85 % (m/v), (anexo B, numeral 1).

- 9 tubos de ensayo 16x150 mm, con 9 mL de medio NFB semisólido (anexo A, numeral 21).

- 9 tubos de ensayo 16x150 mm, con 9 mL de medio LGI semisólido (anexo A, numeral 22).

- 1 caja de Petri con agar NFB (anexo A, numeral 21).

- 1 caja de Petri con agar LGI (anexo A, numeral 22).

- 1 caja de Petri con agar Rojo Congo LGI (anexo A, numeral 23).

- 1 frasco de compota con 10 mL de alcohol etílico al 20% (v/v), (anexo B, numeral 7).

•1 frasco de compota con 10 mL de hipoclorito 2,5% (v/v), (anexo B, numeral 8).

•1 frasco de compota con 10 mL de agua destilada estéril.

•Mortero con brazos estériles.

•Micropipeta de 100 a 1000 uL.

•Puntas para pipeta de 100 a 1000 uL.

•Asa redonda.

•Bisturí.

5.3.4. Curva de calibración para la detección de nitrato (NO_3- - como producto de la oxidación de amonio)

•2 mL de solución stock de KNO_3 de 1000 ppm (anexo B, numeral 9).

•6 mL de solución A compuesta por: Ácido salicílico 5 % (m/v), disuelto en H_2SO_4 al 98% v/v) (anexo B, numeral 9).

•120 mL de solución B compuesta por NaOH 2N (anexo B, numeral 10).

•6 tubos eppendorf de 2 mL para preparar las concentraciones patrón de KNO_3.

•20 mL de agua destilada.

•6 tubos de 16X150 mm para las reacciones de cuentificación de NO_3.

5.3.5. Curva de calibración para la detección de amonio (NH_4+ - Como producto de la reducción asimilativa de NO_3=)

•1 mL de solución stock de $(NH_4)_2SO_4$ de 1000 ppm (anexo B, numeral 11).

•5 mL de solución A para curva de calibración de amonio (anexo B, numeral 12).

•10 mL de solución de hipoclorito de sodio al 0,2 % (v/v) (anexo B, numeral 13).

•150 mL de agua destilada.

•6 tubos eppendorf de 2 mL para preparar las concentraciones patrón de $(NH_4)_2SO_4$.

•6 tubos de 16x150 mm para las reacciones de cuentificación de NO_3.

5.3.6. Determinación de número más probable (NMP) para microorganismos nitrificantes y denitrificantes

•1 frasco de 200 mL, con 90 mL de solución salina 0,85% (m/v) ajustar pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1 N o HCl 1 N (anexo B, numerales 43 y 44).

•4 tubos 16x150 mm, con 9 mL de solución salina 0,85% (m/v), (anexo B, numeral 1).

•16 tubos 16x150 mm tapa rosca anchos y fondo plano, con 9 mL de caldo amonio (anexo A, numeral 24).

•16 tubos de 16x150 mm tapa rosca anchos y fondo plano, con 9 mL de caldo nitrato (anexo A, numeral 25).

•5 pipetas de 5 mL.

•10 g de muestra de suelo, lodo o agua residual.

•Reactivo de Nessler (anexo B, numeral 14).

•Reactivo de Gries (anexo B, numeral 15).

•Polvo de Zinc.

5.4. Equipos

•Incubadora.

•Microscopio óptico.

•Espectrofotómetro.

•Balanza.

5.5. Metodología

5.5.1.Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno asociativos o simbióticos: Rhizobium sp.

•Lavar las raíces con abundante agua corriente o de la llave.

•Seleccionar y aislar los nódulos turgentes, utilice el bisturí.

•Llevarlos al frasco compota con etanol al 20% (v/v) y dejarlos allí durante 2 minutos.

•Extraer los nódulos del etanol con las pinzas y sumergirlos en la solución de hipoclorito de sodio.

•Agitar durante 2 minutos.

•Extraer los nódulos con las pinzas y sumergirlos en el agua destilada estéril.

•Agitar durante 2 minutos.

•Macerarlos cerca del mechero hasta obtener una mezcla líquida.

•Realizar coloración de Gram.

•Observar células Gram negativas en forma de Y y/o polimórficas por la ausencia de pared celular.

•Sembrar por agotamiento en agar YMA.

•Incubar a 35°C durante 48 horas.

•Observar colonias brillantes y de color rosa pálido presuntivas de *Rhizobium* sp.

•Realizar coloración de Gram para observar bacilos Gram negativos cortos y delgados típicos de *Rhizobium* sp.

5.5.2. Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno no asociativos: Azotobacter sp.

•10 g de muestra de suelo.

•Tomar la muestra de suelo y formar gránulos de suelo con pinzas.

•Sembrar 25 gránulos de suelo equidistantes en cada caja de agar Ashby.

•Incubar a 30°C durante 2 semanas.

•Contar los gránulos que presenten expolisacárido y determinar el porcentaje de positivos.

•Determinar si los gránulos positivos presentan pigmentación e informar el color.

•Realizar coloración de Gram al expolisacárido producido alrededor de los gránulos de suelo.

•Observar al microscopio en objetivo 100x buscando la presencia de quistes de *Azotobacter* sp. y exopolisacárido.

5.5.3. Aislamiento de microorganismos microaerófilos fijadores de nitrógeno asociativos

•Tomar la raíz de la planta y lavarla con agua corriente para eliminar la mayor cantidad de partículas de suelo.

•Pesar 1 g de raíces jóvenes poco pigmentadas y con aspecto turgente, utilice el bisturí para cortar los fragmentos seleccionados.

•Con las pinzas llevar las raíces al frasco compota con alcohol etílico al 20 % (v/v) y agitar durante 3 minutos.

•Sacar las raíces del etanol con las pinzas y sumergirlos en la solución de hipoclorito de sodio. Agitar durante 2 minutos.

•Sacar las raíces con las pinzas y sumergirlos en el agua destilada estéril. Agitar durante 2 minutos.

•Sacar con las pinzas y disponer en el mortero.

•Macerar suavemente y recuperar el contenido total en un tubo de solución salina (dilución 10^{-1})

•Realizar las diluciones 10^{-2} y 10^{-3}.

•A partir de la dilución 10^{-1}, tome 1 mL y sembrar los tubos con los medios NFb y LGI. Haga lo mismo hasta sembrar tres tubos por dilución. En total se sembrarán 9 tubos.

•Incubar a 30°C durante 3 días.

•Observar la formación de la biopelícula debajo de la superficie de la columna formada por el medio (2mm bajo la superficie). Verifique la alcalinización del medio por el cambio de la tonalidad hacia un azul más intenso. En el caso del medio LGI el viraje será de amarillo a azul.

•Tomar una asada de la biopelícula formada en los medios semisólidos y sembrar por agotamiento en los medios sólidos respectivos y en agar Rojo Congo.

•Incubar a 30°C durante 48 horas.

•Realizar coloración de Gram y observar al microscopio en objetivo 100x.

Realizar el conteo de tubos positivos por cada dilución y determinar el NMP/g en la tabla para serie de 3 tubos. Se toma como positivo la formación de película, con o sin cambio de color en el medio.

5.5.4. Curva de calibración para la detección de nitrato (NO_3- - como producto final de la oxidación de amonio).

A partir de una solución stock de KNO_3 de 1000 ppm, preparar las siguientes concentraciones para la curva: (anexo B, numeral 15).

Tomar 0,2 mL de cada estándar y adicionar 0,8 mL de la solución A (Ácido salicílico 5% m/v, disuelto en H_2SO_4 al 98% v/v).

•Esperar 20 minutos hasta que la reacción se estabilice.

•Agregar 19 mL de la Solución B (NaOH 2N).

•Esperar la formación de color (Figura 10A) y a que la reacción se enfríe, y medir la absorbancia a 410 nm, ajustando el cero del equipo con el patrón correspondiente.

5.5.5. Curva de calibración para la detección de amonio (NH_4+ - como producto de la reducción asimilativa de NO_3=)

A partir de una solución stock de $(NH_4)_2SO_4$ de 1000 ppm, preparar las siguientes concentraciones para la curva: (anexo B, numeral 11).

•Tomar 0,5 mL de cada estándar y adicionar 0,5 mL de la solución A.

•Agregar inmediatamente 0,5 mL de solución de hipoclorito de sodio al 0,2 % (v/v).

•Esperar 20 minutos para la formación de color (Figura 10B).

•Adicionar 20 mL de agua destilada.

•Esperar 15 min y medir la absorbancia a 650 nm, ajustando el cero del equipo con el patrón correspondiente.

Tabla 4.

Cálculos para preparación de soluciones Stock curva patrón de nitratos

[KNO3] ppm	Vol. Stock	Vol. de agua destilada mL	Vol. final de la reacción mL	Abs410 nm
0			2	
40			2	
60			2	
100			2	
120			2	
200			2	

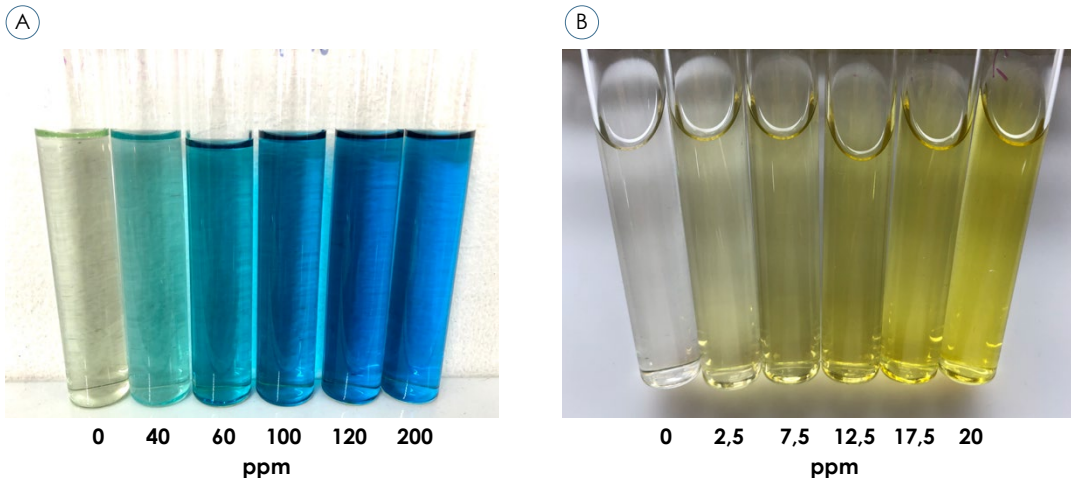
Tabla 5.

Cálculos para preparación de soluciones Stock curva patrón de amonio.

[NH4] ppm	Vol. Stock	Vol. de agua destilada mL	Vol. final de la reacción mL	Abs650 nm
0			2	
2,5			2	
7,5			2	
12,5			2	
17,5			2	
20			2	

Figura 10.

Resultado de las curvas patrón para la determinación de nitrato y amonio. (A). Se observa la formación de color azul para las distintas concentraciones de KNO_3 (0 – 40 – 60 – 100 - 120 y 200 ppm) por la nitración del ácido salicílico bajo condiciones de acidéz elevada en la reacción; el cromóforo tiene su máxima absorbancia a 410 nm en soluciones a pH básico (>12). (B) Se observa la formación de color amarillo para las distintas concentraciones de $(NH_4)_2SO_4$ (0 - 2,5 – 7,5 – 12,5 – 17,5 y 20 ppm) ya que el amonio reacciona con el salicilato y el hipoclorito en presencia del catalizador nitroprusiato (reacción de Betherlot).



5.5.6. Determinación de número más probable (NMP) para microorganismos nitrificantes y denitrificantes

Procesos de nitrificación (Microorganismos nitrificantes):

- Pesar 10 g de material y llevarlos al frasco con 90 mL de solución salina 0,85 % (m/v).
- Realizar diluciones seriadas hasta 10^{-3}.
- Dividir 15 tubos de caldo amonio en tres series de 5 tubos cada una.
- Inocular 1 mL de cada dilución por cada serie de tubos.
- El tubo restante de cada caldo corresponderá al control, SIN inocular.
- Incubar a 30°C durante 16 días.
- Luego de la incubación durante 16 días, adicionar 4 gotas del reactivo de Griess a cada tubo (Figura 11).
- Prueba positiva (+): Rosado.
- Prueba negativa (-): Incoloro.
- A los tubos con reacción (-), adicionar una pizca de polvo de Zinc.
- Prueba positiva (+): Rosado.
- Realizar el conteo de tubos positivos para las determinaciones de NH_4 y NO_3= por cada dilución y determinar el NMP/g en la tabla para serie de 5 tubos (Figura 11).

Procesos de *Denitrificación* (*Microorganismos denitrificantes*):

- Pesar 10 g de material y llevarlos al frasco con 90 mL de solución salina 0,85% (m/v).
- Realizar diluciones seriadas hasta 10^{-3}.
- Dividir 15 tubos de caldo amonio en tres series de 5 tubos cada una.
- Inocular 1 mL de cada dilución por cada serie de tubos.
- El tubo restante de cada caldo corresponderá al control, SIN inocular.

•Incubar a 30°C durante 16 días.

•Luego de la incubación durante 16 días, adicionar 4 gotas del reactivo de Griess a cada tubo.

- Prueba positiva (+): Rosado
- Prueba negativa (-): Incoloro

•En caso de tener resultado incoloro, adicionar 4 gotas del reactivo de Nessler a cada tubo.

- Prueba positiva (+): Amarillo

•Realizar el conteo de tubos positivos para las determinaciones de NH_4 y NO_3= por cada dilución y determinar el NMP/g en la tabla para serie de 5 tubos (Figura 11).

Figura 11.
Posibles resultados del NMP/g de suelo a partir de clado amonio y caldo nitrato



Cortesía de Claudia Marcela Rivera Hoyos.

5.6. Referencias

Baulikar, R., Chaluvadi, SR., Torres, I., Mosali, J., Bennetzen, JL., Udvardi, M. (2020). Nitrogen Fertilization reduces nitrogen fixation activity of diverse Diazotrophs in Switchgrass Roots. Phytobiomes Journal. 1-8. https://doi.org/10.1094/PBIOMES-09-19-0050-FI.

Bellenger, J.P., Darnajoux, R., Zhang X., et al. (2020). Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review. Biogeochemistry. https://doi.org/10.1007/s10533-020-00666-7

Cerón, L., Aristizabal, FA. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. Revista Colombiana de Biotecnología. 14(1), 285-295.
Daims, H., Lebedeva, EV., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, RH., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, PH., Wagner, M. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. Nature. 528(7583), 504–509. https://doi.org/10.1038/nature16461.

Fan, K., Delgado-Baquerizo, M., Guo, X., Wang , D., Wu, Y., Zhu, M., Chu, H. (2019). Suppressed N fixation and diazotrophs after four decades of fertilization. Microbiome. (143), https://doi.org/10.1186/s40168-019-0757-8.

Fonseca-Lopez, D., Vivas-Quila, NJ., Balaguera-Lopez, HE. (2020). Técnicas aplicadas en la investigación agrícola para cuantificar la fijación de nitrógeno: una revisión sistemática. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 21(1), 1-19.

Han, F and Zhou, W. (2022). Nitrogen recovery from wastewater by microbial assimilation – A review. Bioresource Technology. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127933.

He, Sh., Zhao, Zh., Tina, Zh., et al. (2022). Comammox bacteria predominate among ammonia-oxidizing microorganisms in municipal but not in refinery wastewater treatment plants. Journal Environmental Management. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115271.

Huang, L., Riggins, CW., Rodriguez-Zas, S., Zabaloy, MC., Villamil, MB. (2019). Long-term N fertilization imbalances potential N acquisition and transformations by soil microbes. Science of The Total Environment. 562-571. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.154

Elbanna, K., Shahawy, EL., Atalla, KM. (2012). A new simple method for the enumeration of nitrifying bacteria in different environments. Plant and Soil Environment. 49-53.

Kifle, MH., Laing, MD. (2015). Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses. Frontiers in Plant Science. 1225.

Li, Y., Chapman, SJ., Nicol, GW., Yao, H. (2018). Nitrification and nitrifiers in acidic soils. Soil Biology and Biochemistry. 290-301.

Lu, Sh., Liu, X., Liu, Ch., et al. (2019). Review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in freshwater ponds. Reviews in Environmental Science and BioTechnology. https://doi.org/10.1007/s11157-018-9486-.

Martínez. M., Gutiérrez, V., Pedroza, A. (2013) Métodos Microbiológicos, físicos y químicos con aplicación ambiental. Manual de Microbiología. Chile: Editorial Universidad Federico Lleras San María 132p. p.

Martínez, C., Sauvage, S., Bitar, A., et al. (2021). Denitrification in wetlands: A review towards a quantification at global scale. Science of the Total Environmental. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142398.

Ramm, E., Liu, Ch., Ambus P., et al. (2022). A review of the importance of mineral nitrogen cycling in the plant-soil-microbe system of permafrost-affected soils—changing the paradigm. Environmental Research Letters. 17013004.

Ren Y., Ngo, H., Guo, W. (2021). New perspectives on microbial communities and biological nitrogen removal processes in wastewater treatment systems. Bioresource Technology. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122491.

Shi, M., Zhao, Y., Zhu, L., et al. (2020). Denitrification during composting: Biochemistry, implication and perspective. International

Biodeterioration & Biodegradation. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105043.

Soliman M and Eldyasti A. (2018). Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review. Reviews in Environmental Science and BioTechnology. DOI 10.1007/s11157-018-9463-4.

Song, T., Zhang, X., Li, J., et al. (2021). Review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic

denitrification microorganisms (HNADMs). Science of the Total Environmental. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149319.
Stain, LY., Klotz, MG. (2016). The nitrogen cycles. Current biology: Current Biology. 26(3), R94–R98. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021.

Torabian, S., Farhanfi-Abriz., Denton, M. (2019). Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? A review. Soil & Tillage Research. https://doi.org/10.1016/j.still.2018.09.006.

Van-Kessel, MA., Speth, DR., Albertsen, M., Nielsen, PH., Op den Camp, HJ., Kartal, B., Jetten, MS., Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. Nature. 528(7583), 555–559. https://doi.org/10.1038/nature16459.

Zhu, G., Wang, X., Wang, Sh., et al. (2022). Towards a more labor-saving way in microbial ammonium oxidation: A review on complete ammonia oxidization (comammox). Science of the Total Environmenta lSciencience. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154590.

Capítulo 6

CICLO DEL FÓSFORO



Capítulo 6

CICLO DEL FÓSFORO

Claudia Marcela Rivera Hoyos, Viviana Gutiérrez Romero, Lucía Ana Díaz-Ariza, Natalia Sánchez Sánchez, Rodrigo Ortega Blu, María Mercedes Martínez

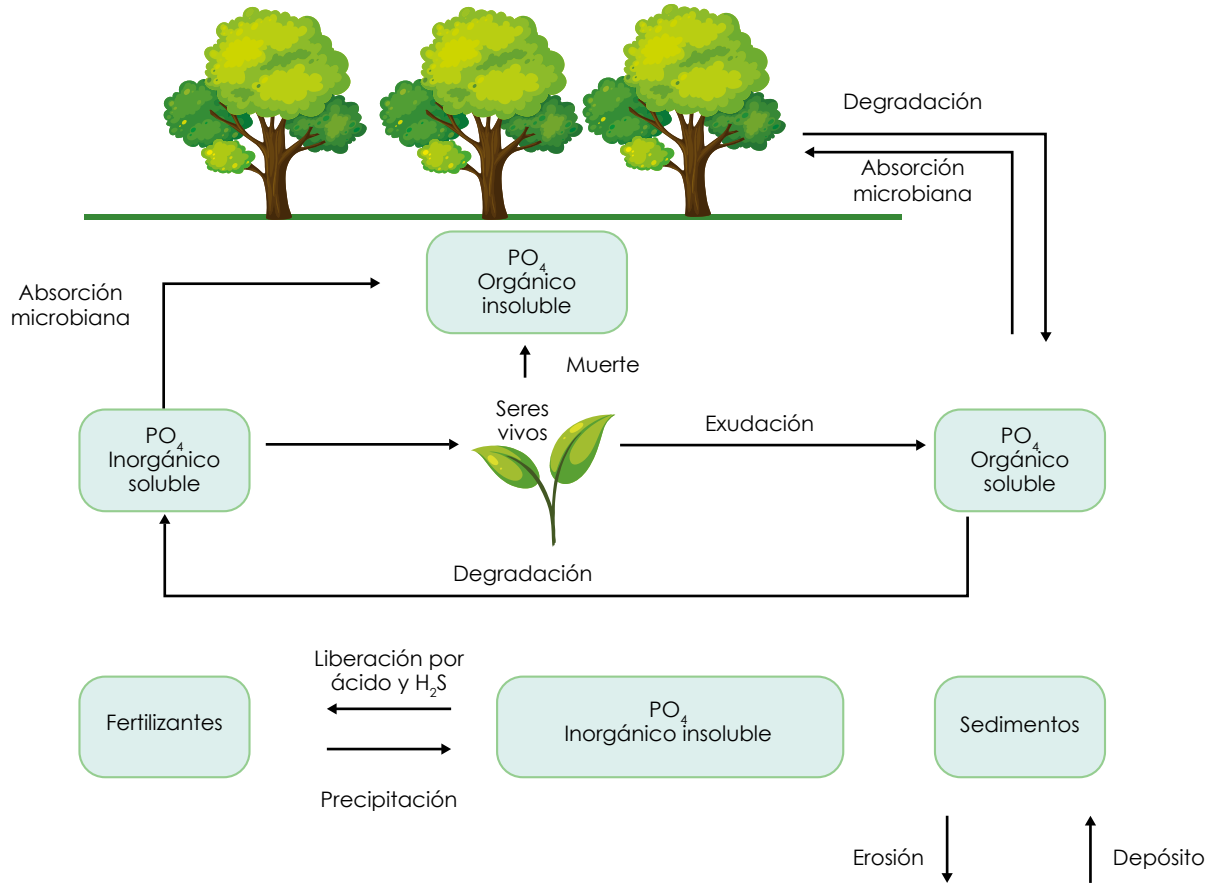
6.1. Introducción

El fósforo es un elemento esencial para todos los seres vivos, y juega un papel relevante en el ambiente en especial porque hace parte de moléculas tan importantes como el ADN o el ATP. Y por tanto está en la naturaleza en formas orgánicas, pero también en formas minerales como la roca fosfórica (Hallama et al., 2019: Kalayu, G 2019: Bindraban et al., 2020; Alewell et al., 2020). Igualmente existen otras fuentes de P como los residuos orgánicos municipales, lodos de depuradora y estiércoles o purines de animales (Ortega & Martínez 2019; Ylivainio et al., 2021). Hoy por hoy la economía circular de los residuos invita a los países y a los productores a mejorar las prácticas agrícolas, y valorar los residuos en relación al contenido de P o N, entre otros elementos, limitando además los efectos negativos de la explotación del P mineral sobre suelo (ácido fosfórico) o en aguas (eutroficación), y generando alternativas para incorporar materia orgánica rica en P al suelo (Golroudbary et al., 2020; Ylivainio et al., 2021) El ciclo de este elemento presenta una diferencia importante con el ciclo biogeoquímico de otros elemento, pues aunque presenta forma gaseosa, fosfito (PH_3), no se reconoce, el componente atmosférico del ciclo (Turner y Raboy, 2019). Aunque se encuentra presente en el suelo, se destaca como un factor nutricional limitante en suelos por su baja movilidad generando zonas de agotamiento en la rizosfera y deficiencias del elemento en la planta (Penn et al., 2019). Microorganismos de diferentes grupos taxonómicos, incluyendo bacterias y hongos tanto filamentosos como levaduriformes (Ferrol et al., 2019; Kalayu, 2019) juegan un papel

importante en el aumento de la disponibilidad de formas de fósforo asimilable a través de procesos de solubilización y de mineralización y en la movilización del elemento hacia la planta (Blanco et al., 2020: Blanco et al., 2021; Blanco et al., 2022).

Los compuestos químicos en los que el elemento está presente en el suelo se pueden agrupar en cuatro formas generales: fósforo inorgánico disponible para plantas y otros organismos, fósforo orgánico no disponible, fósforo inorgánico adsorbido a otros componentes del suelo (minerales secundarios) y fósforo en minerales primarios (Doydora et al., 2020). Estas formas cambian y el elemento fluye en el suelo y hacia otras esferas en los ecosistemas en procesos de meteorización y precipitación, mineralización e inmovilización, adsorción y desorción. De los anteriores, la meteorización, la mineralización y la desorción son aquellos procesos que aumentan la disponibilidad del elemento en el suelo (Stevenson y Cole, 1999; Hyland et al., 2005; Tian et al., 2021). Los microorganismos que participan en el ciclaje del elemento en suelos y aguas tienen la capacidad de solubilizar fósforo a partir de minerales primarios y secundarios (meteorización y desorción), de mineralizarlo a partir de diferentes fuentes orgánicas y de movilizarlo desde el suelo hacia la planta (Wahid et al., 2020; Bargaz et al., 2021). En la figura 12 se presente el esquema general del ciclo de fósforo.

Figura 12.
Ciclo general del fósforo



Cortesía de Lucas David Pedroza Camacho.

6.1.1. Solubilización de fósforo

Los microorganismos fosfato solubilizadores son capaces de crecer en medios con $Ca_3(PO_4)_2$ o minerales insolubles semejantes como única fuente de fosfato, éstos asimilan el elemento y hacen soluble una porción la cual es liberada al medio (Wahid et al., 2020; Bargaz et al., 2021). El fósforo inorgánico se presenta como compuestos de calcio, aluminio, hierro donde puede ser soluble o insoluble (Blanco et al., 2020). Las formas solubles provienen de la mineralización de la materia orgánica en el suelo o la solubilización de rocas fosfatadas y de fertilizantes (Basílio et al., 2022; Blanco et al., 2021). Estos ácidos orgánicos se producen a partir de la oxidación de - fuentes de carbono disponibles, principalmente por vía glucolítica y la oxidación directa de la glucosa hasta la producción de diferentes ácidos carboxílicos que glucónico, ácido cítrico, ácido oxálico) originan la acidificación de la célula y sus alrededores (Blanco et al., 2022). Como consecuencia, el fósforo es liberado desde el fosfato mineral por la sustitución de un protón de calcio. Los ácidos orgánicos producidos comúnmente por especies bacterianas incluyen: ácido láctico, succínico, isovalérico, isobutírico y acético (Kalayu, 2019; Blanco et al., 2020ª; Blanco et al., 2021b), (Figura 13). Esta capacidad de permanecer soluble, depende de varios factores, siendo el pH del suelo el más importante. A pH bajo (por debajo de 6,0) se favorece la formación de fosfatos de hierro, aluminio y manganeso, constituyentes de los minerales arcillosos en suelos con pH entre 3,5 y 5,5, mientras que en suelos alcalinos (por arriba de 8,0) se hacen evidentes los fosfatos con altos contenidos de calcio (Kour et al., 2021; Blanco et al., 2022).

Otros mecanismos de solubilización, incluyen la *oxido Reducción* como estrategia microbiana de transformación de las formas de fósforo no solubles, esto, debido a que el fósforo se encuentra en estados de oxidación que varían desde el -3 de la fosfina al estado oxidado +5 del ortofosfato. Las reacciones de oxidación por los microorganismos se realizan con la utilización del fosfito, el cual se oxida en la célula a compuestos orgánicos de fosfato. Las bacterias utilizan preferentemente fosfatos en lugar de fosfito (Kour et al., 2021; Blanco et al., 2020). La producción de sideróforos es otro mecanismo de solubilización realizada por algunos microorganismos en el que se quelan elementos que están unidos al fósforo como el hierro, liberando fosfato (Cui et al., 2022). Algunos de los quelantes como el 2-cetogluconato, citrato, oxalato y lactato forman un complejo con la porción catiónica del fosfato insoluble forzando de esta manera su disociación (Kour et al., 2021; Blanco et al., 2020; Blanco et al., 2022). Finalmente, se encuentra la reducción de formas minerales de fosfato férrico donde el sulfuro de hidrógeno (H_2S) producido, reacciona con el hierro del fosfato y lo precipita como sulfuro de hierro, liberando así el fosfato (Alori & Babalola, 2017).

Figura 13.
Solubilización de fósforo inorgánico. (A) Agar SMRS1. (B) Agar Pikovskaya



Cortesía de Viviana Gutierrez Romero.

6.1.2. Mineralización de fósforo

La forma esencial del fósforo es el fosfato, presente tanto en forma inorgánica como orgánica haciendo parte de la materia orgánica presente en el suelo. Sin embargo, las formas orgánicas son insolubles, por lo que es precisa la participación de microorganismos para lograr el proceso de mineralización de la materia orgánica y el P entre a la solución de suelo como fosfato soluble. Sin embargo, las condiciones de alcalinidad o acidez de los suelos hacen que el fósforo se convierta en un elemento de baja disponibilidad. Bajo condiciones neutras, la tasa de mineralización de los compuestos orgánicos es muy alta, los microorganismos mineralizan el fósforo orgánico, a través de la secreción de enzimas extracelulares (fosfatasas) liberando de nuevo H_2PO_{4-} (ortofosfato) a la solución de suelo (Blanco et al., 2021b). Las fosfatasas, catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos de H_3PO_4 y son responsables de la mineralización orgánica del fósforo en el suelo y de la consecuente liberación del fósforo inorgánico (Shaw et al., 2020). Las más estudiadas en ecosistemas agrícolas son las fosfomonoesterasas, pueden tener carácter ácido o alcalino, de acuerdo con la actividad óptima del pH, y actúan sobre compuestos de P de bajo peso molecular que incluyen mononucleótidos, azúcares de fosfato y polifosfatos (Behera et al., 2017). Las fitasas (EC 3.1.3.8), son un un grupo de fosfatasas que realizan la hidrólisis parcial o total de los ortofosfatos presentes en el ácido fítico, principal forma de fósforo orgánico presente en cereales, leguminosas y en las semillas oleaginosas. Estas enzimas actúan rompiendo los enlaces *fosfomonoéster*, degradando los fitatos a mioinositolhexafosfato y fósforo inorgánico. Entre los principales microorganismos productores de fitasas se encuentran *Aspergillus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y levaduras (Naves et al., 2014).

6.1.3. Micorrizas, simbiosis para la movilización y transferencia de fósforo

La micorriza es una asociación simbiótica mutualista entre hongos de suelo y la raíz viva de una planta, caracterizada por la transferencia de nutrientes entre los organismos que conforman la asociación a través de estructuras especializadas. La planta adquiere compuestos inorgánicos, principalmente fósforo, mientras que transfiere componentes orgánicos al hongo (Brundrett 2004; Brundrett, 2009; Wahid et al., 2020). Además del aumento en la captación de nutrientes que favorece el crecimiento de la planta, hay otras funciones de la micorriza que han sido descritas, tales como el incremento en la captación de agua y la tolerancia a estrés biótico y abiótico en las plantas, además del mejoramiento de la estructura del suelo (Gianinazzi et al., 2010; Díaz-Ariza et al., 2013).

6.1.3.1. Tipos de micorriza

En la tabla 5 se describen los tipos de micorrizas que se conocen actualmente: la ectomicorriza, la ectendomicorriza y cinco tipos de endomicorriza. Cada uno de ellos presenta diferentes estructuras formadas por los organismos simbiontes, que a su vez son distintos según el tipo de micorriza la clase de compuestos que se intercambian entre los organismos involucrados (Cuenca, 2015; van der Heijden et al., 2015; Smith and Read, 2008).

Micorriza arbuscular

Este tipo de micorriza es el más ampliamente distribuido en ecosistemas y agroecosistemas tropicales. Una de lass estrategias de las plantas en suelos con baja disponibilidad de fósforo es la formación de la micorriza arbuscular. Los hongos colonizan las células vegetales y desarrollan micelio extraradical que permite ampliar el área del suelo más allá de la raíz para captar nutrientes, traslocarlos hacia la raíz y transferirlos a las células vegetales. En la mayoría de las plantas, una parte del fósforo es adquirido vía micorriza y otra a través de la epidermis de la raíz, pero otras veces, específicamente en plantas que dependen de la micorriza, todo el fósforo que la planta adquiere es por medio de la simbiosis (Ferrol et al., 2019).

Durante el estudio de la micorriza arbuscular es posible observar sus estructuras y cuantificar la colonización fúngica dentro de la raíz de la planta hospedera a través de microscopía luego de pasar las raíces colonizadas por un proceso de aclarado y tinción (ICONTEC, 2018; Phillips y Hayman, 1970). Los hongos formadores de micorriza arbuscular, pertenecientes a la división

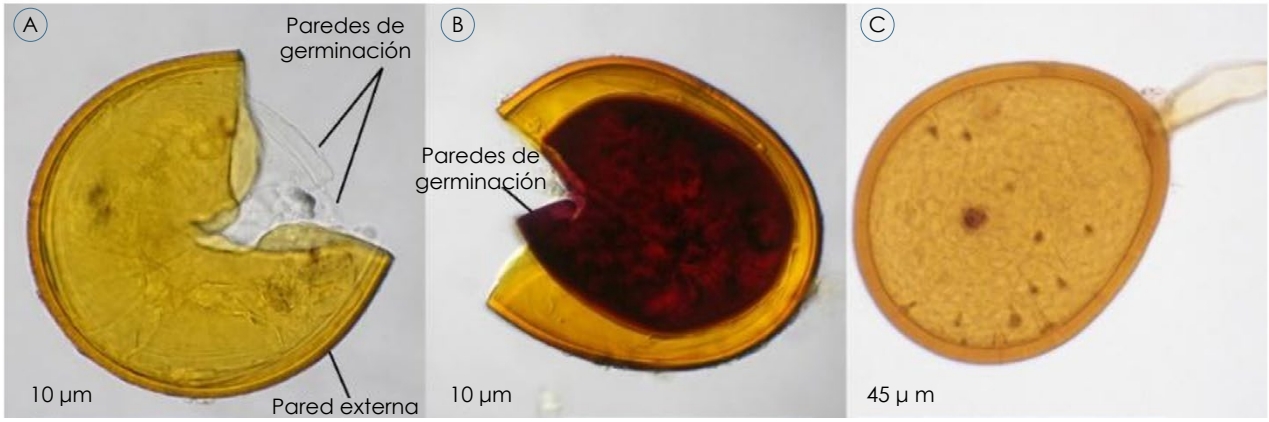
Glomeromycota (Tedersoo et al., 2018), se propagan por medio de esporas. Las características de estos propágulos varían entre taxones, y su observación ha sido una de las formas tradicionales de llevar a cabo aproximaciones taxonómicas. Las esporas generalmente son aisladas del suelo para su estudio (Gerdemann y Nicholson, 1963; ICONTEC, 2018; Jenkins, 1964). Las estructuras morfológicas más importantes de las esporas en el momento se su clasificación es: el tamaño, el color, la presencia de diferente número y tipo de paredes, la presencia de ornamentaciones en ellas, presencia de distinto número de capas en cada pared, la reacción al reactivo Melzer y las estructuras de germinación (Cuenca, 2015). En la figura 14 se observan tres esporas de Glomeromycota. Adicionalmente, en figura 15 se observan estructuras intraradicales de hongos formadores de micorriza arbuscular.

Tabla 6.
Tipos de micorriza (basada en Brundrett, 2004)

Tipo de micorriza	Hongos simbiontes	Plantas hospederas	Estructuras características y colonización
Ectomicorrizas			
Ectomicorriza	Basidiomycota Ascomycota	Angiospermas Gimnospermas	Hifas septadas Red de Hartig Manto
Arbutoide	Basidiomycota	Orden Ericales	Hifas septadas Red de Hartig Manto (puede estar presente) Enrollados intracelulares
Monotropoide	Basidiomycota	Familia Monotropaceae	Hifas septadas Red de Hartig Manto (puede estar presente) Estructuras intracelulares
Ectendomicorriza			
Ectendomicorriza	Basidiomycota Ascomycota	Angiospermas Gimnospermas	Hifas septadas Red de Hartig Manto reducido o inexistente Puede haber colonización intracelular
Endomicorrizas			
Ericoide	Ascomycota	Orden Ericales	Hifas septadas Estructuras intracelulares
Orquidioide	Basidiomycota	Familia Orchidaceae	Hifas septadas Enrollados intracelulares
Arbuscular	Glomeromycota	Angiospermas Gimnospermas Briofitas Pteridófitas	Hifas aseptadas Estructuras intracelulares: Arbúsculos, enrollados, vesículas

Figura 14.

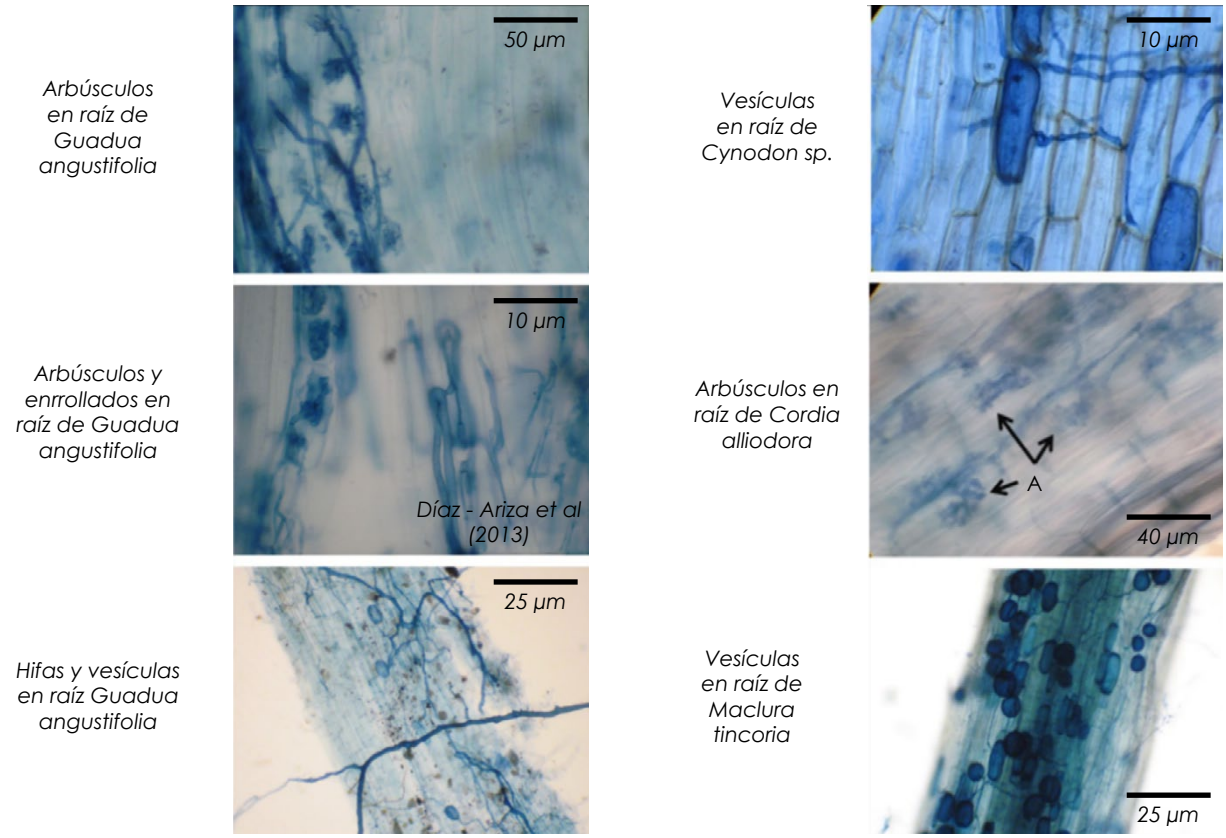
Esporas de diferentes Glomeromycota aislados de suelos colombianos. Acaulospora colombiana en PVGL, pared de germinación y pared externa. b. Acaulospora colombiana en PVGL con Melzer. c. Espora con hifa de suspensión.



Cortesía de Luciana Díaz.

Figura 15.

Estructuras intraradicales de hongos formadores de micorriza arbuscular con un aumento de 40 x.



Cortesía de Luciana Díaz.

6.2. Objetivos

Objetivo general

- Realizar el aislamiento y la caracterización de microorganismos del ciclo del fósforo a partir de muestras de suelo y de raíces.

Objetivos específicos

- Conocer los mecanismos biológicos para la solubilización de fósforo empleados por diferentes grupos microbianos.

- Realizar la recuperación cuantitativa de microorganismos solubilzadores fosfato-asociados con la producción de ácidos orgánicos sobre medios específicos.

- Reconocer estructuras de micorriza arbuscular en suelos, bioinoculantes y raíces de plantas.

- Determinar las actividades enzimáticas de varios tipos de fosfatasas.

6.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo

6.3.1. Recuento de microorganismos solubilizadores de fósforo

- 1 frasco Shcott de 250 mL, con 90 mL de medio SMRS1 líquido, sin indicador de pH (anexo A, numeral 26).

- 4 cajas de Petri con agar sólido SMRS1 (Baschan, 1998), con indicador de pH (anexo A, numeral 27).

- 4 cajas de agar Petri con agar Pikovskaya (Pikosvskaya, 1948; Novo, 1983), (anexo A, numeral 28).

- 7 tubos de 16x150 mm, 9 mL de agua peptonada al 0,1% (m/v), (anexo B, numeral 2).

- Pipeta automática de 100-1000 µL.

- Puntas para pipeta automática.

- 5 rastrillos de vidrio.

- 10 g de suelo rizosférico.

- Colorantes de Gram.

- Aceite de inmersión.

6.3.2. Actividad fosfatasas alcalinas

- 10 mL de cultivo de microorganismos fosfato solubilizadores.

- 5 tubos de 2 mL para centrífuga.

- 2 tubo 16 x 150 mm con 1 mL de 4-p-nitrofenil fosfato (0,025 mM), (anexo B, numeral 16) preparado en una solución buffer universal MUB a pH 7,0 (anexo B, numeral 17).

- 5 tubos 16 x 150 mm.

- 1 frasco Schott de 50 mL con 20 mL NaOH (0,5 M), (anexo B, numeral 18).

- 1 frasco Schott de 50 mL con 10 mL $CaCl_2$ (0,5 M), (anexo B, numeral 19).

- 1 frasco Schott de 25 mL p-nitrofenol (0,01 – 0,06 µmol/L), (anexo B, numeral 20).

- Papel filtro Whatman No 42.

- Embudo.

- Pipeta automática de 100-1000 µL.

- Puntas para pipetaautomática.

6.3.3. Actividad fitasas

- Buffer acetato de Sodio 200 mM, (pH 5.0), (anexo B, numeral 21).

- Solución de 1 g/L^{-1} Ácido fítico (*Sodium Salt Phytate*, Sigma), (anexo B, numeral 22).

- Mezcla reveladora para fitasas (AAM: 1:1:2 de Molibdato de amonio 10 mM, H_2SO_4 2,5 M y Acetona 100 %), (anexo B, numera 23).

- Solución de ácido cítrico 1 M (anexo B, numeral 24).

- 1 tubo de 16 x 150 mm por reacción enzimática.

- Pipeta automática de 100-1000 µL.
- Puntas para pipeta automática.

6.3.4. Colonización de hongos formadores de micorriza arbuscular en raíces.

- Raíces de plantas hospederas de hongos de micorriza arbuscular.
- Bisturí.
- Pinzas de punta fina.
- Tubos de 50 mL.
- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos de 22 x 44 mm.
- KOH 10% (m/v), (anexo B, numeral 25).
- H_2O_2 (10% o 30% v/v), (anexo B, numeral 26).
- HCl (1% v/v), (anexo 2, numeral 27).
- Azul de tripano (0,05% m/v) https:// invam.wvu.edu/methods/recipes , (anexo B, numeral 28).
- Polivinil lactoglicerol (PVGL) https:// invam.wvu.edu/methods/recipes.

6.3.5. Análisis de fósforo en suelo

- 2,5 gramos de muestra (suelo) tamizado a 2 mm.
- 2 erlenmeyer de 100 mL.
- 2 papel filtro wathman N 42 o similar.
- 2 embudos.
- 8 tubos de vidrio de 25x155 mm.
- 2 balón aforado de 1000 mL.
- 1 balón aforado de 250 mL.
- 2 balón aforado de 200 mL.
- Handy-step y 2 jeringas de 50 mL.
- Micropipetas de 1000 mL.
- Puntas para micropipeta.
- $NaHCO_3$ 0,5 M. (anexo B, numeral 29).
- Solución patrón de KH_2PO_4 (anexo B, numeral 30).
- Reactivo A para cuantificar fósforo (anexo B, numeral 31).
- Reactivo B (anexo B, numeral 32).
- Celdas de cuarzo.

6.4. Equipos

- Balanza de tres brazos.
- Incubadora.
- Microscopio óptico.
- Agitador horizontal termostatado.
- Baño serológico.
- pHmetro.
- Shaker.
- Balanza.
- Espectrofotómetro.
- Centrifuga.

6.5. Metodología

6.5.1. Recuento de microorganismos solubilizadores de fósforo

- Pesar 10 g de suelo.
- Inocular en 90 mL de medio SMRS1 sin indicador de pH.
- Incubar a 30°C durante 2 días.
- A partir del medio realizar diluciones hasta 10^{-7}.
- Sembrar en agar SMRS1 con indicador de pH 0,1 mL las diluciones 10^{-2} a 10^{-7}.
- Incubar a 30°C durante 48 horas.

•Realizar el recuento de colonias que presentan zonas de aclaramiento y acidificación a su alrededor.

•Informar el recuento en UFC/g de muestra analizada y realizar coloración de Gram y azul de lactofenol según el caso.

•Sembrar en agar Pikovskaya 0,1 mL de las diluciones 10^{-2} a 10^{-7}.

•Incubar a 30 °C durante 48 horas.

•Realizar el recuento de colonias que presentan zonas de aclaramiento a su alrededor.

•Informar el recuento en UFC/g de muestra analizada y realizar coloración de Gram y azul de lactofenol según el caso.

6.5.2. Actividad fosfatasa alcalina

•Centrifugar 1,5 mL de cultivo bacteriano a 10000 rpm durante 10 min.

•En un tubo limpio colocar 1 mL del sobrenadante microbiano y 1 mL del sustrato p-nitrofenil fosfato (0,025 mM) y 4 mL de buffer universal modificado MUB a pH 11.

•Incubar a 37°C durante una hora en agitación contínua.

•Adicionar 4 mL de NaOH (0,5 M) y 1 mL de $CaCl_2$ (0,5 M) para detener la reacción enzimática.

•Filtrar el contenido de la reacción a través de papel filtro Whatman No. 42.

•Leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de λ420 nm.

•Transformar los valores a concentración de p-nitrofenol empleando la ecuación de la recta obtenida en la curva patrón (0,01 - 0,06 µmol/L).

•Calcular la actividad enzimática definida como: una unidad fosfatasa (1UP) es igual a una µmoL min/mL de *p-nitrofenol* liberado, bajo las condiciones de reacción.

6.5.3. Actividad fitasas

Mezcla de reacción:

•1 mL de muestra (blanco, patrón de Pi, sobrenadante, o extracto enzimático).

•4 mL de Buffer Acetato de Sodio 200 mM, (pH 5.0).

•1 g/L^{-1} Ácido fítico (*Sodium Salt Phytate*, Sigma).

•Incubar la mezcla de reación durante 15 min a 40°C.

•Tomar 500 µL de la mezcla y agregar inmediatamente a 4 mL de la mezcla AAM (Revelador), (1:1:2 de Molibdato de amonio 10 mM, H_2SO_4 2,5 M y Acetona 100%).

•Vórtex durante 15 seg para homogenizar la muestra y para que se forme el amarillo del ácido fosfomolíbdico.

•Agregar 400 µL de Ácido Cítrico 1 M (para formar un complejo con el exceso de Molibdato).

•En caso de que se forme un precipitado, centrifugar antes de medir la absorbancia.

•Medir la Absorbancia a 355 nm y determinar los µM de fosfato liberado según la curva standard de KH_2PO_4.

•Para la determinación de los µM de fosfato liberados se despeja en la curva patrón de KH_2PO_4 y se usa la ecuación 13 para determinar la actividad enzimática.

$$\frac{Unidades}{mL} \text{ de enzima} = \frac{\mu M \text{ de fosfato liberado} \times FD}{(15)\times(0,5)}$$

(Ecuación 13)

Donde:

FD: Factor de dilución

15: Tiempo (en minutos) de incubación de la mezcla de reacción para la definición de las unidades enzimáticas.

0,5: Volumen (en mililitros) de la enzima usada (sobrenadante del cultivo o extracto enzimático).

Para la actividad Fitasa, basada en el análisis de Pi liberado, una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µM de Pi del ensayo enzimático por minuto (i.e. fosfato liberado de todos los inositoles fosfato presentes).

6.5.4. Metodología reconocimiento de estructuras de Micorrizas aclarado y tinción de raíces

- Lavar las raíces y disponerlas en los tubos.
- Adicionar el KOH y llevar los tubos a 90°C en el baño termostatado durante 15-25 minutos (observar frecuentemente las raíces). Si están claras y el haz vascular es visible, pasar al siguiente paso.

  • Lavar las raíces con agua corriente.

  • Añadir el H_2O_2 a las raíces durante 10 minutos.

  • Lavar con agua corriente.

  • Acidificar con el HCl por 15 minutos.

  • Eliminar el HCl y sin lavar adicionar el azul de tripano.

  • Llevar nuevamente los tubos con las raíces al baño termostatado a 90°C durante 10 minutos.

  • Retirar las raíces y lavar con agua corriente.

  • Cortar fragmentos de raíz de 2cm.

  • Disponer los fragmentos paralelamente al lado más corto de la lámina, en el portaobjetos.

  • Añadir PVGL formando una línea horizontal delgada sobre las raíces y cubrir con un cubreobjetos de 22 x 44 mm.

Observación de estructuras y cuantificación del porcentaje de colonización

• Observar la lámina bajo el microscopio con el objetivo 10x, moviendo el carro portaobjeto de manera perpendicular.

• Buscar estructuras como hifas, arbúsculos, enrollados y vesículas. Tomar como referencia las estructuras presentadas en la figura 15.

• A medida que se mueve el carro portaobjeto, en cada campo observado registrar si hay presencia o no de alguna estructura de la micorriza arbuscular.

• Calcular el porcentaje de colonización con la ecuación 14:

$$\text{Porcentaje de colonización} = \frac{\text{Número de campos colonizados}}{\text{Número de campos observados}} \times 100$$

(Ecuación 14)

6.5.5. Análisis de fósforo en suelo

6.5.5.1. Preparación de la muestra

• Secar la muestra temperatura ambiente.

• Tamizar la muestra a 2 mm.

6.5.5.2. Procedimiento de extracción

• Pesar 2,5 g de la muestra previamente preparada en un Erlenmeyer de 100 mL, y adicionar 40 mL de extractante.

• Agitar en Shaker oscilatorio a 180 rpm durante 30 min.

• Transcurrido el tiempo de agitación se debe filtrar la solución a través de un papel filtro Whatman 42 o similar, si el filtrado se ve turbio se debe volver a filtrar.

• Preparar el blanco de muestra, de acuerdo a los pasos anteriores con una solución de extractante sin muestra, cada 15 muestras.

• A partir del filtrado obtenido previamente, se realiza la determinación de P-Olsen contenido en la muestra.

6.5.5.3. Cuantificación de fósforo disponible (PO_4-), mediante el método P-Olsen.

- Tomar 1 mL de cada estándar, del extracto de suelo, o blanco según corresponda en un tubo de ensayo de 25x155.
- Agregar 12 mL de agua destilada.
- Adicionar 2 mL de reactivo de color. Se sugiere agregar solución de cloro cada 66 muestras.
- Agitar en vortex hasta homogenizar.
- Dejar 10 min para estabilizar reacción.
- Medir la absorbancia a λ= 882 nm, ajustando el cero con el estándar de 0 ppm.

6.5.5.4. Cálculo de la concentración de P-olsen en suelo

- Realizar la regresión lineal con los datos de la curva de calibración graficando absorbancia vs concentración para hallar la ecuación de la recta (y = mx + b)
- Reemplazar el valor de absorbancia obtenido de la muestra, en la ecuación de la recta, siendo este valor correspondiente a "y" en la ecuación, obteniendo así la ppm de PO^{4-} presentes en la muestra.
- Multiplicar dicho valor por el factor de dilución, en el caso de que se haya realizado.
- Restar al valor la concentración obtenida en el blanco.
- Multiplicar dicho resultado por 16, con el fin de que el resultado sea expresado en mg PO^{4-}/Kg de suelo (ecuación 15).

$$\text{P - olsen (mg/kg)} = (a-b) \times \frac{\text{mL extractante}}{g\ mx} \times D$$

a = ppm muestra b = ppm blanco
D = factor de dilución (si aplica)

(Ecuación 15)

6.6. Referencias

Alewell, Ch., Ringeval, B., Ballabio, C., et al. (2020). Global phosphorus shortage will be aggravated by soil erosion. Nature Comunications. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18326-7.

Alori, ET., Glick BR., Babalola, OO. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. Frontiers in microbiology. 8, 971. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971.

Bargaz, A., Elhaissoufi, W., Khourchi, S., et al. (2021). Benefits of phosphate solubilizing bacteria on belowground crop performance for improved crop acquisition of phosphorus. Microbial Research. https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126842.

Basilio F., Dias, T., Santana, M., et al. (2022). Multiple modes of action are needed to unlock soil phosphorus fractions unavailable for plants: The example of bacteria- and fungi-based biofertilizers. Applied Soil Ecology. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104550.

Behera, BC., Yadav, H., Singh, S., Mishra, RR., Sethi, BK., Dutta, SK., Thatoi, HN. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of Serratia sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 15(1), 169-178.

Bindraban, P., Dimkpa, Ch., Pandey, R. (2020). Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health. Biology and Fertility od Soils. https://doi.org/10.1007/s00374-019-01430-2.

Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, LM., Sánchez-Castro, N., Garzón-Jaramillo, R., Pedroza-Camacho, LD., Poutou-Piñales, RA., Rivera-Hoyos, CM., Díaz-Ariza, LA., Pedroza-Rodríguez, AM. (2020). Phosphate-solubilizing Pseudomonas sp. and Serratia sp., co-culture for Allium cepa L. growth promotion. Heliyon 6 (2020) e05218. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05218.

Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, LM., Sánchez-Castro, N., Herrera-Carlosama, L.,

Poutou-Piñales, RA., Díaz-Ariza, LA., Gutiérrez-Romero, EV., Rivera-Hoyos, CM., Ardila-Leal, LD., Pedroza-Rodríguez, AM. (2021). Bio-inoculant Production Composed by Pseudomonas sp., Serratia sp., and Kosakonia sp.: Preliminary effect on Allium cepa L. growth at Plot Scale. Universitas Sceitierum.

Blanco, A., Chacón, Ma A., Quintero, Ma. Ca., et al. (2022). Production of pine sawdust biochar supporting phosphate-solubilizing bacteria as an alternative bioinoculant in Allium cepa L., culture. Scientific Reports. https://doi.org/10.1038/s41598-022-17106-1.

Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biological Reviews. 79, 473–495. doi: 10.1017/S14647931030063.

Brundrett, MC. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. Plant Soil. 320, 37–77.

Cuenca, G. (2015). Las micorrizas arbusculares: aspectos teóricos y aplicados. Las micorrizas arbusculares: aspectos teóricos y aplicados (Ediciones IVIC, Ed.). Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela.

Cui, K., Xu, T., Chen, J., et al. (2022). Siderophores, a potential phosphate solubilizer from the endophyte Streptomyces sp. CoT10, improved phosphorus mobilization for host plant growth and rhizosphere modulation. Journalof Cleaner Production. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133110.

Díaz-Ariza, LA., García, A., Sandoval, W. (2013). Constantino S. Importancia de los microorganismos rizosféricos en la propagación de especies leñosas. Suelos Ecuatoriales. 43, 95-107.

Doydora, S., Gatiboni, L., Grieger, K., et al. (2020). Accessing Legacy Phosphorus in Soils. Soil Systems. doi:10.3390/soilsystems4040074.

Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., Pérez-Tienda, J. (2019). Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. Plant Science. 280, 441–447.

Gerdemann, JW., Nicholson, TH. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society. 46, 235–244.

Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, MN., van Tuinen, D., Redecker, D., Wipf, D. (2010). Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. Mycorrhiza. 20, 519–530.

Golroudbary, S., Wali, M., Kraslawski, A. (2020). Rationality of using phosphorus primary and secondary sources in circular economy: Game-theory-based analysis. Environmental Science and Policy. https://doi.org/10.1016/j.envsci.2020.02.004.

Hakkou, R., Benzaazoua, M., Bussière, B. (2016). Valorization of phosphate waste rocks and sludge from the moroccan phosphate mines: challenges and perspectives. Procedia Engineering. 138, 110-118, 10.1016/j.proeng.2016.02.068.

Hallama, M., Pekrum, C., Lambers, H. (2019). Hidden miners – the roles of cover crops and soilmicroorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. Plant Soil. https://doi.org/10.1007/s11104-018-3810-7.

Hyland, C., Ketterings, Q., Dewing, D., Stockin, K., Czymmek, K., Albrecht, G., Geohring, L. (2005). Phosphorus Basics – The Phosphorus Cycle. Nutrient Management Spear Program. http://nmsp.css.cornell.edu.

ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5842:2018. Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Requisitos. 2018.

Jenkins, WR. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant disease reporter. 48, 692.

Kalayu, G. (2019). Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. International Journal of Agronomy. https://doi.org/10.1155/2019/4917256.

Kour, D., Rana, K., Kaur, T., et al. (2021). Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and -mobilizing microbes: A review. Pedosphere. doi:10.1016/S1002-0160(20)60057-1.

Naves, L., Rodrigues, PB., Bertechini, AG., Corrêa, AD., de Oliveira, DH., de Oliveira, EC., Duarte, WF., da Cunha, MR. (2014). Comparison of methodologies to quantify phytate phosphorus in diets containing phytase and excreta from broilers. Asian-Australasian journal of animal sciences. 27(7), 1003–1012. https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13538.

Novo, R., Quintana, E., Valdés, R. (1983). Prácticas de microbiología. Primera edición. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La Habana. Facultad de Agronomía. Cuba. 47.

Ortega y Martinez. (2019). Sustainable Use of Animal Slurries in Chile. (2019). Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research. 13(2).
Phillips, JM., Hayman, DS. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society. 55, 158–161.

Pikovskaya, RI. (1948). Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya. 17, 362-370.

Pen, Ch and Camberato, J. (2019). Critical Review on Soil Chemical Processes that Control How Soil pH A_ects Phosphorus Availability to Plants. Agriculture. doi:10.3390/agriculture9060120.

Shaw, A and Cleveland C. (2020). The effects of temperature on soil phosphorus availability and phosphatase enzyme activities: a cross-ecosystem study from the tropics to the Arctic. Biogeochemistry. https://doi.org/10.1007/s10533-020-00710-6.

Smith, SE., Read, DJ. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. Third edit. Academic Press.

Stevenson, FJ., Cole, MA. (1999). Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. 2nd. Edition. New York Wiley. 427.

Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Koljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. Fungal Diversity. 90, 135-159.

Tian, J., Ge, F., Zhang D., et al. (2021). Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. Biology. https://doi.org/10.3390/biology10020158.

Turner, BL., Raboy, V. (2019). Phosphorus cycle. Access Science. Retrieved June 16, 2020, from https://doi.org/10.1036/1097-8542.508930.

Van der Heijden, MGA., Martin, FM., Selosse, MA., Sanders, IR. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. New Phytologist. 205, 1406–1423.

Wahid, F., Fahad, S., Danish S., et l. (2020). Sustainable Management with Mycorrhizae and Phosphate Solubilizing Bacteria for Enhanced Phosphorus Uptake in Calcareous Soils. Agriculture. doi:10.3390/agriculture10080334.

Capítulo 7

CICLO DEL AZUFRE



Capítulo 7

CICLO DEL AZUFRE

Claudia Marcela Rivera Hoyos, Viviana Gutiérrez Romero, René Novo, María Mercedes Martínez, Camilo Jiménez.

7.1. Introducción

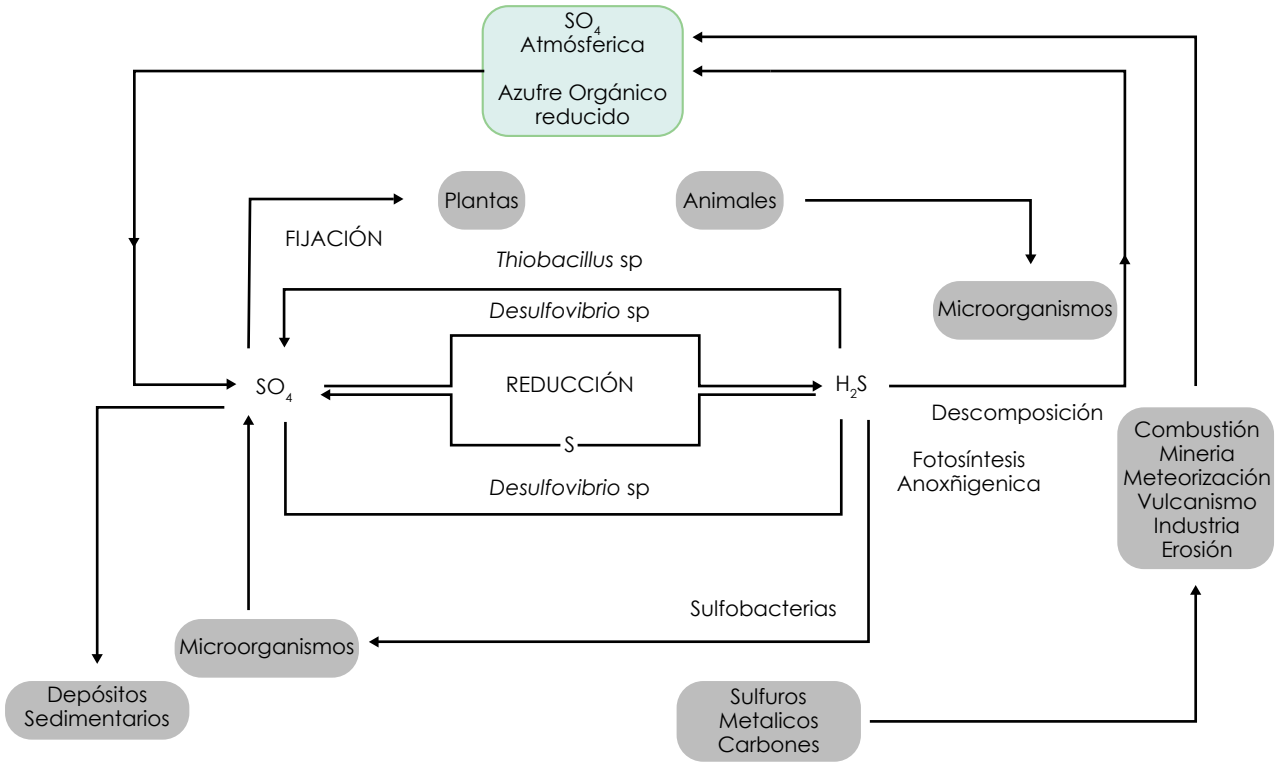
El Azufre (S) es uno de los elementos más abundantes sobre la tierra, y es un elemento esencial para los organismos vivos (Novo, 1983) y se encuentra principalmente en forma de pirita (FeS_2) o yeso ($CaSO_4$) en rocas y sedimentos y como sulfato (SO_4) en los océanos. Es requerido para la formación de proteínas, grupos prostéticos, y recursos de las fitoquelatinas como alinas en cebolla o ajo o glucosinolatos en repollo), polímeros y enzimas como ferrodoxinas o nitrogenasa que dependen para su acción catalítica de la presencia de grupos –SH. En el ambiente se encuentra tanto en suelo, como agua y atmósfera. En suelo y agua se encuentra en forma orgánica e inorgánica, siendo esta última la más abundante pero no disponible (Liu et al., 2021).

El ciclo del azufre es complejo, debido a que este elemento presenta un amplio rango de estados de oxidación que va desde -2 (completamente reducido), como el sulfuro - H_2S, hasta +6 (completamente oxidado), como el sulfato – SO_4. Así mismo, el azufre puede ser transformado tanto biológica como químicamente en la naturaleza. Adicionalmente, el ciclo del azufre se encuentra estrechamente relacionado con otros ciclos, como los del carbono y el nitrógeno (Liu et al., 2021; Grubba et al., 2022). Los microorganismos juegan un papel fundamental en las transformaciones de azufre, donde, por ejemplo, el azufre que está presente en la atmosfera como SO_4, producto de la oxidación de compuestos reducidos (ej. H_2S) puede ser reducido por microorganismos para producir nuevamente H_2S proceso que se lleva a cabo principalmente por

las bacterias sulfato reductoras (BSR) que pueden usar el SO_4 como aceptor final de electrones (respiración anaeróbica de SO_4) en la degradación de materia orgánica (Muyzer & Stams, 2008; Wu et al., 2021). Por otra parte, el sulfuro (H_2S) producido por las BSR puede usarse en procesos de oxidación por bacterias quimiolitótrofas para la generación de energía (desasimilación), produciendo azufre elemental (S^0) y SO_4, este último, puede ser asimilado por plantas o retenido en depósitos sedimentarios en el mar (Jorgensen et al., 2021; Wu et al., 2021). En el ciclaje de azufre, las bacterias rojas y verdes del azufre, en condiciones anaeróbicas, realizan el proceso de fotosíntesis anoxigénica, utilizando el SO4 como aceptor de electrones. Igualmente, en el ciclo del azufre se destacan bacterias quimioheterótrofas oxidadoras, empleadas en los procesos de biolixiviación de metales, como *Thiobacillus*, *Thiotrix* y *Thiospira* (Nguyen et al., 2021). Así mismo, en el proceso de reducción en condiciones de bajas tensiones de O_2, se destacan microorganismos como *Desulfovibrio* spp., *Desullfobacter* spp., *Desulfococcus* spp., etc (Zhang et al., 2022). En la figura 16 se presenta el esquema general del ciclo del azufre. Estas bacterias, aunque se encuentran en el suelo, participan en procesos ambientales en condiciones extremas, como volcanes, fuentes termales, profundidades de los océanos o sistemas agrícolas anaeróbicos (arroz bajo inundación). Igualmente son muy importantes en los procesos de corrosión biológica de materiales, que ocasionan pérdidas importantes en la industria petrolera, de la construcción, naval y participan en los procesos de biodeterioro de materiales expuestos al aire libre (biodeterioro de monumentos y estructuras metálicas), (Lou et al., 2021).

Figura 16.

Estructuras intraradicales de hongos formadores de micorriza arbuscular con un aumento de 40x.

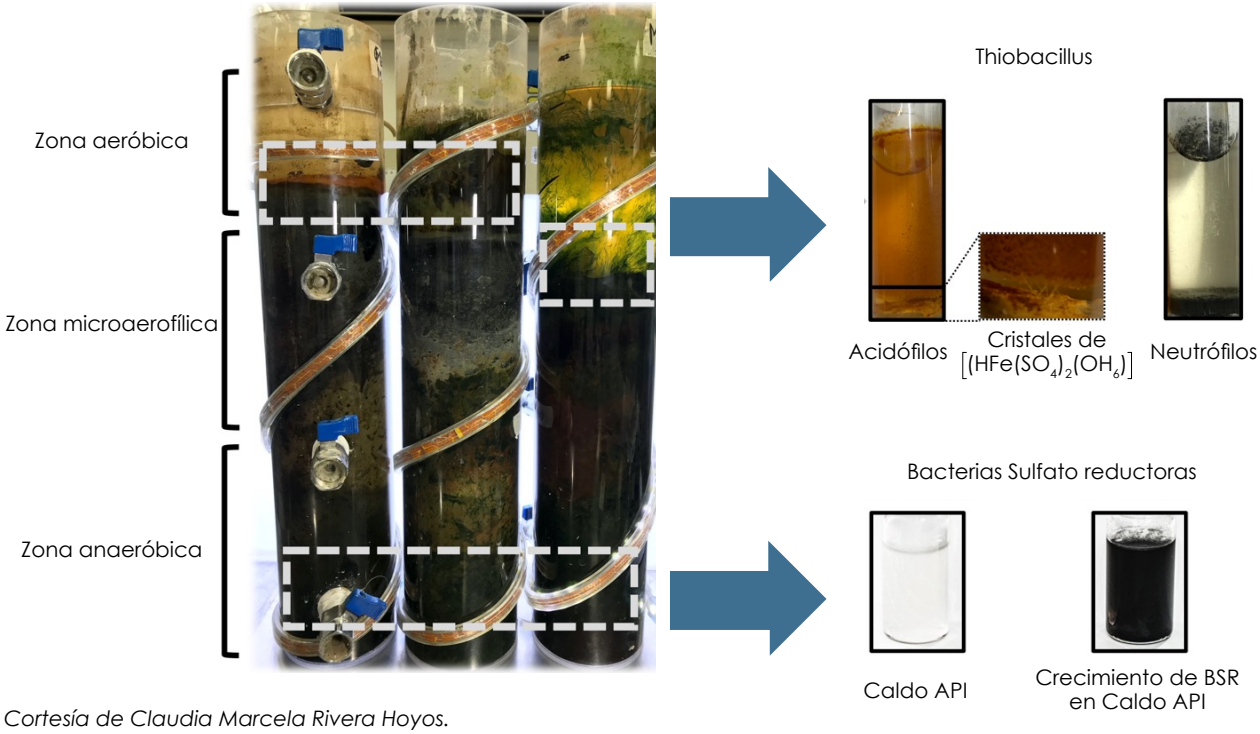


Cortesía de Lucas David Pedroza Camacho.

La columna de Winogradsky es un modelo de ecosistema microbiano preparado por adición de sedimentos en un cilindro con suplementos adicionales e incubado con luz (Pérez and Guzmán 2020; Suleiman et al., 2021). A lo largo del tiempo se desarrollan gradientes ambientales que facilitan la conformación de diferentes nichos y a su vez enriquecen y permiten el desarrollo de grupos específicos de bacterias (Figura 17). Este medio enriquecido puede ser empleado para el estudio de comunidades microbianas en suelo, sedimentos, sistemas de manglar o cultivos bajo inundación como el arroz, la estructura y su función (Novo, 1983; Esteban et al., 2015; Sujata and Nandkumar 2022). En la medida que el tiempo transcurre, gracias a la actividad microbiana se establecen gradientes de O_2 y nutrientes a lo largo de la columna, resultando en una multitud de nichos para el crecimiento de los microorganismos. La dinámica ecológica inicia con los productores primarios, los cuales usan la luz como fuente de energía quienes favorecen el establecimiento de un ecosistema microbiano estructurado en el que ocurren procesos fundamentales para mantener el ciclaje de todos los nutrientes (Babcsányi et al., 2017; Sujata and Nandkumar 2022). Aunque la columna de Winogradsky se usa principalmente con fines pedagógicos para estudiar la diversidad microbiana y el ciclaje de nutrientes, tiene numerosas aplicaciones como el enriquecimiento de cultivos, aislamiento de nuevos microorganismos, biorremediación y la generación de biohidrógeno, además de ser un modelo útil para estudiar la influencia del ambiente en la estructura de las comunidades microbianas, ya que las comunidades más complejas se pueden mantener o manipular en condiciones de laboratorio cuidadosamente controladas (Esteban et al., 2015; Sujata and Nandkumar 2022).

Figura 17.

Sistemas de transformación bifásica para el estudio de ciclo del azufre en la columna de Winogradsky. La columna de Winogradsky representa el comportamiento ecológico de las comunidades microbianas en ambientes estratificados donde se establecen gradientes de nutrientes, oxígeno y luz. Es un modelo útil para estudiar la influencia del ambiente en la estructura de las comunidades, ya que las más complejas se pueden mantener o manipular en condiciones de laboratorio cuidadosamente controladas.



Cortesía de Claudia Marcela Rivera Hoyos.



7.1.1. Reacciones de óxido-reducción asociadas al ciclo del Azufre: Columna de Winogradsky, como modelo

Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos para evidenciar el crecimiento de microorganismos involucrados en la transformación del azufre, es la columna de Winogradsky. Esta columna es un ecosistema que simula una columna de lodo y agua con gradiente de oxígeno que recibe luz, donde se desarrollan bacterias fotoautotróficas y heterótrofas. La altura de la columna permite el desarrollo de una zona aeróbica en la superficie del lodo, de una zona microaerofílica en la parte media, y de una zona anóxica en la parte inferior (Figura 17). La columna se expone a la luz de manera que diversas poblaciones fotosintéticas se desarrollan a diferentes profundidades (Yaşa et al., 2006; Fernández-Rendón et al., 2021). El lodo o sedimento presente, contiene sustratos de carbono orgánico, sulfuro y sulfatos. Esto permite el desarrollo de numerosas poblaciones heterótrofas y fotoautótrofas, entre las cuales se encuentran bacterias anaerobias y fotosintéticas del azufre (Khasimov et al., 2021). Las cianobacterias y algas (microorganismos fotosintéticos oxigénicos) crecen en la superficie aeróbica, el oxígeno producido por estos organismos mantiene una zona aeróbica en la que pueden desarrollarse poblaciones heterótrofas aerobias de bacterias y hongos (Khasimov et al., 2021; Fernández-Rendón et al., 2021).

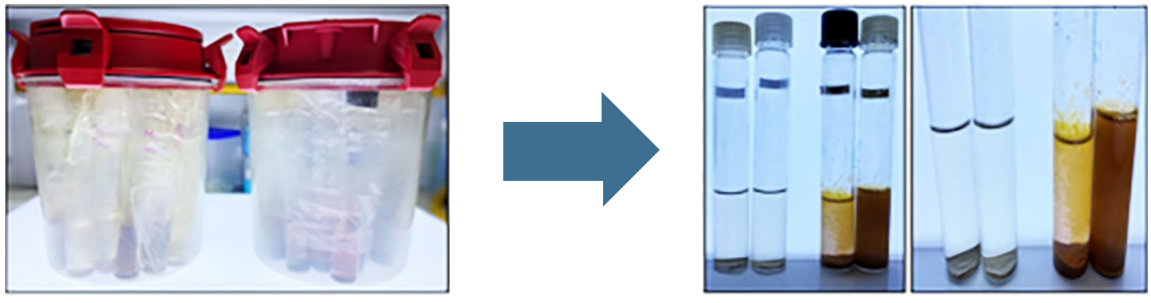
La concentración de oxígeno disuelto en el sistema disminuye conforme se gana en profundidad, de forma que la capa de agua inmediatamente por encima del sedimento tiene una concentración de oxígeno baja y recibe H_2S que difunde desde el sedimento como producto del metabolismo de las bacterias sulfato reductoras. Esta zona es ideal para el crecimiento de *Beggiatoa* y *Thiobacillus* que son aerobios oxidadores de sulfuro (Khasimov et al., 2021; Fernández-Rendón et al., 2021). La parte superior de la columna adquiere tonos marrón-rojizo debido al crecimiento bacterias Rodospiraláceas, fotoheterótrofos anaerobios no del azufre que utilizan compuestos orgánicos reducidos como donadores de electrones. Por debajo de éstos, se desarrollan las bacterias rojas

del azufre (Cromatiáceas) las cuales oxidan el sulfuro dando a la zona una coloración roja vivo (Fernández-Rendón et al., 2021). Aún más abajo, una capa verdosa indica el crecimiento de bacterias verdes del azufre (Clorobiáceas), estas bacterias son anaerobias estrictas, que llevan a cabo el metabolismo fotoautótrofo y fotoheterótrofo usando sulfuro y azufre como donadores de electrones. Los sulfuros producidos por el metabolismo de los reductores del sulfato son utilizados por las bacterias fotosintéticas del azufre verdes y rojas. La zona de color negro intenso que se extiende hacia arriba desde el fondo de la columna denota la actividad de los reductores de sulfato (*Desulfovibrio, Desulfotomaculum*, etc.), (Zhang et al., 2022). El color negro se debe a los sulfuros metálicos, principalmente sulfuros ferrosos (FeS), (Bottrell and Newton, 2006).

Las bacterias sulfato reductoras poseen la desulfoviridina, una sulfatorreductasa que se encuentra en algunos de los géneros y sirve para identificarlas mediante la adición de NaOH y el sometimiento del caldo a Luz UV a 366 nm (Figura 18), (Yaşa et al., 2006; Zhang et al., 2022).

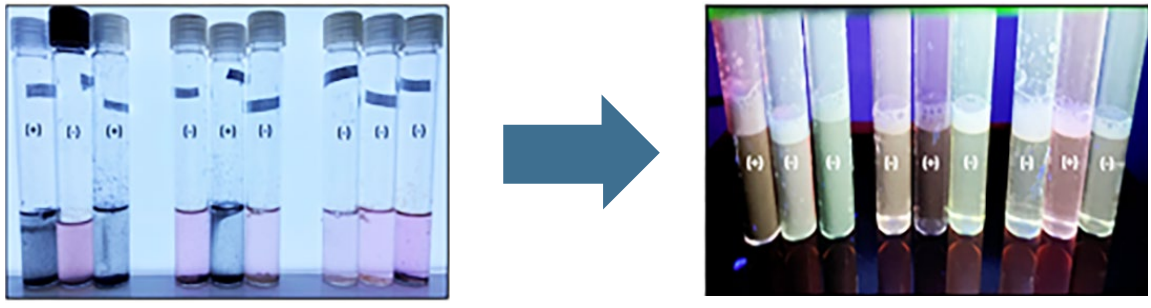
> Una capa verdosa indica el crecimiento de bacterias verdes del azufre (Clorobiáceas), estas bacterias son anaerobias estrictas.

Figura 18.
Enriquecimiento de bacterias oxidadoras de azufre en medios para Thiobacillus nutrófilos y Thiobacillus acidófilos y número más probable de bacterias sulfato reductoras (BSR) en caldo API y Thiobacillus. Cortesía de Claudia Rivera Hoyos.



Cultivo bacterias sulfato reductoras y sulfuro oxidadoras

Bacterias sulfato oxidadoras neutrófilas y acidófilas



Bacterias sulfato reductoras (BSR)

BSR productoras de Desulfoviridna (sulfito reductasa)

Cortesía de Claudia Rivera Hoyos

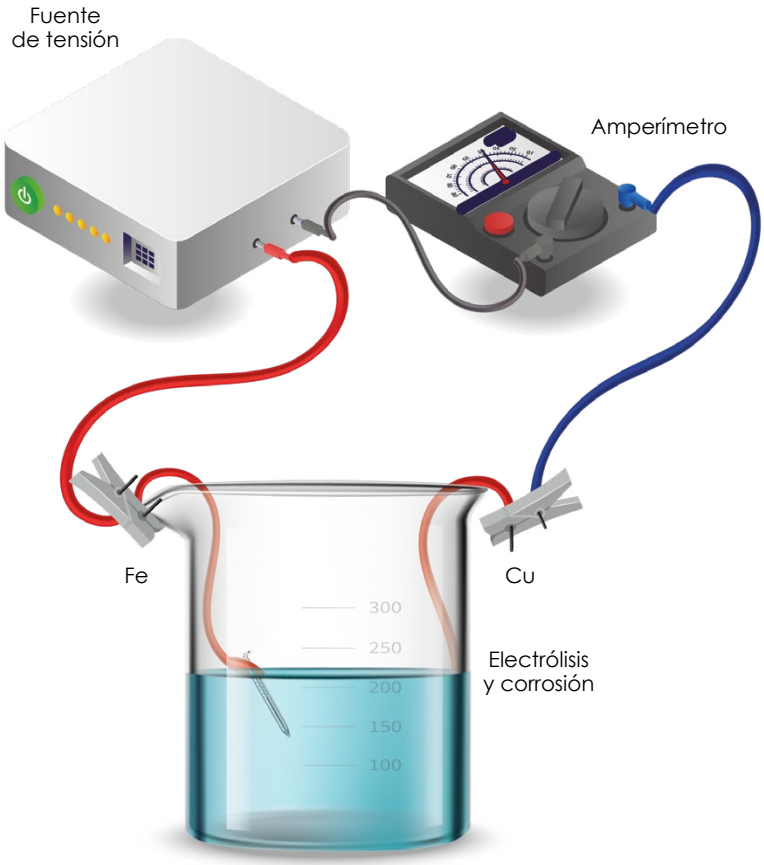
7.1.2. Corrosión electroquímica

La corrosión electroquímica se puede definir como el deterioro de un metal como consecuencia de un ataque químico debido a que tienen electrones libres y son capaces de establecer pilas electroquímicas dentro de su estructura (Parra y Martínez, 2003), (Figura 19).

La corrosión electroquímica es un proceso espontáneo, que implica la existencia de una zona anódica, que sufre corrosión, una zona catódica y un electrolito, además de una unión eléctrica entre ánodos y cátodos (Parras y Martínez, 2003). La reacción electroquímica total consiste en la suma de las reacciones de óxido-reducción y no puede resultar acumulación de iones, es decir, la velocidad total de oxidación debe ser igual a la velocidad total de reducción, dicho de otra manera, los electrones generados en la oxidación se deben consumir en la reacción (Callister, 2000). Como presencia de la oxidación, los iones metálicos pueden incorporarse a la disolución, o pueden formar componentes con elementos no metálicos (Callister, 2000).

En el suelo, sistemas hidráulicos o marinos, por su contenido de humedad variable, sales y materia orgánica en descomposición, puede ocurrir el proceso, siendo el agua la que actúa como electrolito. La corrosión de este sistema se debe principalmente a los procesos de degradación observados en estructuras enterradas, la intensidad dependerá de factores como el contenido de humedad, pH, presencia de microorganismos, composición química, entre otros (Parra y Martínez, 2003).

Figura 19.
Sistema in vitro para la evaluación de corrosión electroquímica.



Cortesía de Luis Camilo Jimenez.

7.2. Objetivos

Objetivos generales

- Evaluar in vitro el comportamiento de las bacterias responsables de la transformación biológica del azufre, empleando como modelo la columna de Winogradsky.

- Evaluar in vitro un proceso de corrosión electroquímica.

Objetivos específicos

- Realizar el montaje de la columna de Winogradsky empleando lodos y agua proveniente de ecosistemas anaeróbicos o facultativos.

- Evaluar en función del tiempo las sucesiones microbianas implicadas en las etapas reactivas y oxidativas del ciclo del azufre.

- Determinar el NMP/mL de bacterias sulfato reductoras valorando la presencia de FeS y desulfoviridina.

- Pre enriquecer y observar en medios líquidos las reacciones in vitro desarrolladas por bacterias del género *Thiobacillus* acidófilos y *Thiobacillus* neutrófilos.

- Evaluar el efecto de la corriente eléctrica sobre un material metálico.

- Evaluar el efecto de la corriente eléctrica y sales sobre un material metálico.

7.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo

7.3.1. Montaje de columnas de Winogradsky

- Lodos de alcantarilla o de humedal.

- Papel periódico picado sin tinta.

- Agua residual.

- Columnas de vidrio o acrílico de 50 cm de alto por 19 cm de ancho. Sellada en unos de sus extremos para que puede adicionarse los lodos y el agua.

- Puntilla de hierro.

- Vinilpel o petrifilm.

- Tiras indicadoras de pH.

- Frasco de vidrio de 50 mL.

- Pipetas de 1 mL.

- Aceite de inmersión.

- Agua destilada.

- Colorantes de Gram.

- 0,5 g $CaSO_4$.

- 0,5 g $CaCO_3$.

7.3.2. Número más probable para bacterias sulfato reductoras

- 1 pipeta de 1mL.

- 1 frasco Schott de 250 mL con 90 mL de solución salina al 0,85 % (m/v), (anexo B, numeral 1).

- 9 tubos de 16x150 mm tapa rosca con 9 mL de medio API (anexo A, numeral 29).

- Campana de anaerobiosis.

- 1 sobre de Gas-Pak o AnareroGen®.

- 1 sobre de indicador de óxido-reducción resarzurina.

7.3.3. Enriquecimiento de Thiobacillus

- 2 tubos de 16 x 150 mm con 10 mL de medio *Thiobacillus* acidófilos (anexo A, numeral 30).

- 2 tubos de 16 x 150 con 10 mL de medio *Thiobacillus* neutrófilos (anexo A, numeral 31).

- 2 pipetas de 0,1 mL.

- Tiras indicadoras de pH.

7.3.4. Corrosión electro química

- 1 puntilla de hierro.
- 1 alambre de Cobre No. 12.
- Beaker de 500 mL con agua.
- Sal de cocina.
- Agua.

7.4. Equipos

- Incubadora.
- Balanza de tres brazos.
- Lámpara de luz ultravioleta de 366 nm.
- Voltímetro.
- Amperímetro
- Balanza de tres brazos.
- Sensor de pH.
- Lámpara de luz visible o fluresente o cintillas LED pegadas al cilindro de vidrio o acrílico

7.5. Metodología

7.5.1. Montaje de columnas de Winogradsky

- Adicionar el papel periódico picado en el fondo de los cilindros de vidrio o acrílico que funciona como columnas de Winograsdky.
- Adicionar el lodo hasta 2/3 del frasco de la columna.
- Adicionar 200 mL de agua residual doméstica.
- Adicionar el $CaSO_4$ y $CaCO_3$.
- Cubrir con vinipel la boca del frasco.
- Iluminar con lámpara durante 1 - 1,5 meses.
- Con tiras indicadoras, medir una vez por semana el pH de la zona baja, media y alta.
- Realizar una vez a la semana, coloración de Gram de la zona baja, media y alta.
- Observar al microscopio en el objetivo 100x.

7.5.2. Número más probable para bacterias sulfato reductoras

- Tomar 10 g o 10 mL de lodo de la columna de la parte media baja.
- Transferirlos a un frasco Schott de 250 mL que contiene 90 mL de solución salina al 0,85 % (m/v).
- Homogenizar la muestra que corresponde a la dilución 10^{-1}.
- Realiza diluciones seriadas 10^{-2} y 10^{-3}.
- Transferir 1 mL de cada dilución a cada uno de los tubos de 16x150 tapa rosca que contiene el caldo API.
- Colocar los tubos en la campana de Anaerogen®.
- Colocar el sobre con el catalizador dentro de la campana.
- Cerrar herméticamente la campaña.
- Incubar los tubos por 15 días a 19°C.
- Retirar los tubos de la campana y colocarlos en una gradilla de acuerdo con la dilución.
- Realizar la lectura de los tubos que presenten color negro por la producción de sulfuro del hierro (Fe_2S).
- Registrar el número de tubos positivos por dilución y buscar la combinación de tubos en la tabla para número más probable para serie de tres tubos.
- El resultado se reporta como NMP/g o NMP/mL para bacterias sulfato reductoras.
- Colocar los tubos positivos en una zona oscura y exponerlos a la luz ultravioleta a 366 nm.

•Registrar el número de tubos positivos que presenten fluorescencia roja, asociada con la producción de sulfoviridina.

•Registrar el número de tubos positivos por dilución y buscar la combinación de tubos en la tabla para el número más probable para serie de tres tubos.

•El resultado se reporta como NMP/g o NMP/mL para bacterias sulfato reductoras productoras de sulfoviridina asociados posiblemente con el género de *Desulfovibrio* spp.

7.5.3. Enriquecimiento de *Thiobacillus* spp.

•Extraer 5 mL del líquido presente en la zona alta de la columna.

•Incubar en oscuridad, a 28°C durante 2 semanas.

•Lectura para *Thiobacillus acidophilus*, el hierro férrico (Fe^{3+}) forma un complejo sulfato mineral [$Hfe(SO_4)_2(OH_6)$], observar turbidez en el medio, a causa del crecimiento de los microorganismos

•Medir pH, realizar coloración de Gram, y observar al microscopio.

•Lectura para *Thiobacillus neutrophilus* el medio contiene tiosulfato (S_2O_3) que se rompe a sulfito (SO_3^{2+}) con producción de ATP, y el otro átomo de azufre se convierte en S0 insoluble, observar turbidez en el medio, a causa del crecimiento de los microorganismos.

•Medir pH, realizar coloración de Gram, y observar al microscopio

7.5.4. Corrosión electroquímica.

•Adicionar 20 g de sal en el frasco de precipitado que contiene agua y disolver.

•Pesar la puntilla de hierro antes de iniciar el proceso.

•Conectar la puntilla al ánodo, y el alambre al cátodo de la fuente de poder.

•Encender la fuente eléctrica y ajustar a 6 voltios.

•Observar y anotar los cambios ocurridos en el transcurso de 30 minutos.

•Pesar la puntilla nuevamente.

•Al ponerse en contacto el soluto con las moléculas de agua se disminuye la fuerza de atracción entre los iones de sal y a su vez los dipolos del agua son atraídos por ellos rodeándolos y removiendo los iones que están en la superficie del cristal impidiendo que vuelvan al mismo y así se van difundiendo por todo el solvente hasta llegar a disolverse por completo. Al disociarse el NaCl cada ion va a reaccionar con el hierro formando color verde oscuro difuminado por todo el beaker debido a las siguientes reacciones:

$$Fe + N\alpha Cl\ FeCl + N\alpha +$$

$Fe + NaCl \rightarrow FeCl + Na+$ (Ecuacion 16)

$Na^{+} + H_2O \rightarrow NaOH + H_2$ (Ecuacion 17)

$3Fe + 4H_2O \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2$ (Ecuacion 18)

$Fe^{+3} + OH- \rightarrow FeOH$ (Ecuacion 19)

El $Fe^{+3}(OH)_3$ se deshidrata, y forma $Fe^{+2}(OH)^2$

(Ecuacion 20)

•Es así que estas reacciones se presentan simultáneamente y el $Fe^{+3}(OH)$ forma el color amarillo junto con el Fe_3O_4. Igualmente, se presenta una coloración negra debido a la formación de $Fe^{+2}(OH)_2$, y presencia de burbujas debido al desprendimiento de H_2 en las reacciones. Finalmente, se logrará reducir el peso de la puntilla, de manera proporcional a la cantidad de NaCl añadida al comienzo de la práctica, infiriéndose de esta manera que hubo corrosión del hierro.

7.6. Referencias

Babcsányi, I., Meite, F., Imfeld, G. (2017). Biogeochemical gradients and microbial communities in Winogradsky columns established with polluted wetland sediments. FEMS microbiology ecology. 93(8), 10.1093/femsec/fix089. https://doi.org/10.1093/femsec/fix089.

Bottrell, SH., Newton, RJ., (2006). Reconstruction of changes in global sulfur cycling from marine sulfate isotopes. Earth-Science Reviews. 75,59– 83.

Callister, W. (2000). Ciencia e Ingeniería de los materiales. Editorial Reverté. Barcelona, España. 67.
Esteban, DJ., Hysa, B., Bartow-McKenney, C. (2015). Temporal and Spatial Distribution of the Microbial Community of Winogradsky Columns. PloS one. 10(8), e0134588. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134588.

Fernández, C.I., Barrera, G., Romero, H., et al. (2021). Influence of the cellulose and sulfate ratio on voltage generation inWinogradsky columns. Revista Mexicána de Inegenieria Química. https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2292.

Grubba, D., Yin, Z., Majtacz, J., et al. (2022). Incorporation of the sulfur cycle in sustainable nitrogen removal systems - A review. Journal of Cleaner Production. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133495.

Jorgensen, B., Findaly A., Pellerin A. (2019). The Biogeochemical Sulfur Cycle of Marine Sediments. Frontiersin Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2019.00849.

Khasimov, M., Laurinavichene, T., Petushkova, E., et al. (2021). Relations between Hydrogen and Sulfur Metabolism in Purple Sulfur Bacteria. Mikrobiologiya. 90(5): 515-530.

Liu, Lu., Xie, G., Xing, D., et al. (2021). Sulfate dependent ammonium oxidation: A microbial process linked nitrogen with sulfur cycle and potential application. Environmetal Research. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110282.
Lou, Y., Chang, W., Cui, T., et al. (2021). Microbiologically influenced corrosion inhibition mechanisms in corrosion protection: A review. Bioelectrochemistry. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107883.

Muyzer, G., & Stams, AJ. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. Nature reviews. Microbiology, 6(6), 441–454. https://doi.org/10.1038/nrmicro1892.

Nguyen,T., Won,S., HA, M., et al. (2021). Bioleaching for environmental remediation of toxic metals and metalloids: A review on soils, sediments, and mine tailings. Chemosphere. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131108.

Novo, R., La Vida Microbiana en el suelo. La Habana, Cuba: Instituto Superior de Ciencias Agrarias.

Parra, A., Martínez, M. (2003). Influencia de los microorganismos en la corrosión del acero al carbono enterrado. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 89.

Pérez, M and Guzmán R. (2020). Microorganisms on StageWinogradsky columns as performative displays in art and science. Performance Research a Journal of the Performing Arts. http: //dx.doi.org/10.1080/13528165.2020.1807748.

Sujata, D and Nandkumar, K. (2022). Use of the Modified Winogradsky Microcosm Technique to Help in Building an Indigenous Culture. Collection of Iron and Sulphur Bacteria Valuable in Green Synthesis of Gold Nanoparticles. Ecology Environmental and Conservation. http://doi.org/10.53550/EEC.2022.v28i01s.034.

Suleiman, M., Choffat, Y., Daugaard U., et al. (2021). Large and interacting effects of temperature and nutrient addition on stratified microbial ecosystems in a small, replicated, and liquid-dominated Winogradsky column approach. Microbiology Open. https://doi.org/10.1002/mbo3.1189.

Yaşa, İ., Çadırcı, B., Koçyigit, A., Öztürk, T. (2006). Enrichment and Isolation of Anoxygenic Phototrophic Bacteria in Winogradsky Column. E.U. Journal of Ficheries & Aquatic Science. 23, 71-73.

Wu, B., Liu, F., Fang, W., et al. (2021). Microbial sulfur metabolism and environmental implications. Science of The Total Environment. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146085.

Zhang, Z., Zhang, C., Yang, Y., et al. (2022). A review of sulfate-reducing bacteria: Metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment. Journal of Cleaner Production. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134109.



Capítulo 8

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES



Capítulo 8

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Aura Marina Pedroza-Rodríguez, Lucas David Pedroza Camacho. Juan Felipe Mateus. Juan Camilo Lores Acosta. Nicolas Yuseb Bulla. Nelson Alejandro Amaya Orozco; Juan Carlos Salcedo Reyes, Claudia Rivera Hoyos. Adriana Ines Páez Moraeles. Fidson-Juarismy Vesga Pérez.

8.1. Introducción

El agua residual es cualquier tipo de agua cuyas características físicas, químicas y microbiológicas se modificaron o alteraron por la influencia antropogénica (Thanigaivel et al., 2022). El agua residual puede ser clasificada según su origen como aguas residuales domésticas (ARD) y aguas residuales no domésticas (ARnD); dependiendo la actividad agro-industrial o de servicios, sus características físicas, química y microbiológica cambian, generando diferentes impactos ambientales si no son tratadas antes de realizar el vertimiento a los sistemas de alcantarillado, cuerpos de agua superficiales de agua dulce o agua marína (Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2015; Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2018).

A nivel internacional los diferentes países también cuentan con una normatividad ambiental rigurosa para aguas residuales, reutilización de las mismas y para aguas potables. En Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA) es la responsable de administrar, implementar y hacer cumplir las leyes ambientales. En especial la ley Federal de Agua Limpia (Clean Water Act), la cual regula, controla la contaminación de las aguas y desarrolló los estándares nacionales para la calidad del agua y los límites de descarga de aguas residuales a aguas navegables (EPA, 2020).

La Ley de Agua Limpia también prohíbe derramamientos potencialmente dañinos de aceite y de ciertas sustancias peligrosas. Estos estándares son controlados tanto a nivel nacional como estatal. Adicionalmente, la

EPA, a través del Título 40, partes 401 a 471, del Código de Regulaciones Federales (cfr por sus siglas en inglés), promulgó las Guías y Normas de Descarga de Efluentes (*Effluent Guidelines and Standards*) para 56 tipos de industria (EPA, 2020).

En la Comunidad Europea la normatividad esta dada por Directiva 2000/60/CE, la cual establece el marco comunitario de actuación en el ámbito de política de aguas superficiales continentales, aguas de transición, aguas costeras y subterráneas. Adicionalmente, establece los procedimientos que deberán seguir los estados miembros de la Unión Europea para el establecimiento de las normas de calidad química. Esta directiva tiene por objeto lograr la eliminación de todas las sustancias peligrosas prioritarias y contribuir a conseguir concentraciones en el medio acuático cercanas a los valores básicos para las sustancias de origen natural.

En relación del uso del agua residual tratada para riego en agricultura o también llamado reutilización de aguas; existen dos referentes internacionales. Por un lado, está la escuela del estado de California, con el Título 22, que ha sido la base de las recomendaciones de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (2021). Por otro, están las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS. 1989). El Título 22 busca disminuir el riesgo en la población involucrada en el reuso y al emplearla a su vez no se generen nuevos impactos ambientales. Por el contrario, la OMS ha centrado sus directrices en estudios de cuantificación del peligro microbiológico y estudios epidemiológicos para garantizar un riesgo tolerable que puede estar entre 10^{-6} y 10^{-4}, lo que implica que sólo una persona en un millón de casos o una en 10 000 se vea afectada en su salud por una actividad de reúso (Campos y Saconi, 2014; Weber y Campos, 2016).

8.1.2. Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales presenta una gran relevancia frente a las problemáticas ambientales de los recursos hídricos a escala global, estos subproductos líquidos pueden ser generados normalmente por sectores domésticos, industriales y comerciales, en condiciones muy variadas lo que supone un enorme esfuerzo por evitar que lleguen a ríos, lagos o mares sin un tratamiento previo, al igual que la variedad de contaminantes que pueden estar presentes en estos subproductos líquidos también existe una variedad de impactos negativos que derivan del vertido sin tratamiento previo a cuerpos de agua como, disminución de la calidad eco sistémica, cambios en las calidades fisicoquímicas y microbiológicas, olores ofensivos, muerte de especies especialmente sensibles a cambios, etc (Sánchez et al., 2018; Ahmad et al., 2019).

Independiente del origen del agua residual (doméstica, no doméstica industrial y no doméstica agroindustrial), se debe realizar un tratamiento antes del vertimiento y buscar la posibilidad de re uso en diferentes sectores productivos (Puentes et al., 2021; Chen et al., 2022). Por lo tanto, debe cumplir con los estándares para vertimiento y re uso. Es por esto que los sistemas de tratamiento para aguas pueden tener diferentes mecanismos que van desde el tratamiento in situ por medio de sistemas tratamiento unificados específicos para cada vertimiento o bien pueden ser transportados por líneas de tuberías que conducen el vertimiento a un tren de tratamiento más especializado, es de gran importancia que este tipo de vertimientos cumplan concentraciones óptimas para su descarga (Chen et al., 2022). Sin importar su naturaleza se encuentran sujetos a regulaciones legales locales, departamentales y nacionales (MADS, 2015; Pedroza et al., 2018). En una estación depuradora básica se llevan a cabo las etapas de pre tratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario. Con manejo interno de la línea de aguas (afluentes contaminados), línea de lodos (subproductos del tratamiento del agua de tipo primario y secundario) y la línea de gases (productos gaseosos de la línea de lodos cuando son estabilizados por vía anaeróbica (Pedroza et al., 2018; Rivera et al., 2018; Céspedes et al., 2021). En la tabla 7 se presentan la descripción de las etapas de tratamiento, tecnologías empleadas y que tipo de contaminante que se elimina. Adicionalmente, en la figura 20 se presenta el esquema general de una planta de tratamiento básica para aguas residuales industriales.

Tabla 7.
Operaciones unitarias para plantas de tratamiento de aguas residuales.

Etapas de tratamiento y unidades representativas	Definición	Contaminante que reducen/ eliminan	Referencia
Tratamiento primario			
Rejillas de desbaste grueso, medio y fino	Operación física que elimina sólidos por separación diferencial de tamaño	Sólidos de gran tamaño que generan obstrucción	Ramírez et al., 2019
Desarenado	Operación física que elimina sólidos inorgánicos por diferencia de densidad	Sólidos sedimentables de tipo inorgánico	Sánchez et al., 2018
Igualación/ neutralización	Operación física que permite ajustar los caudales, temperatura y pH	No elimina ningún contaminante, permite reducir la variación de carga y caudal que entra al sistema de tratamiento, es usado por lo general como sistema preventivo previo al tratamiento biológico	Pedroza et al., 2018 Sánchez et al., 2018
Sedimentación primaria convencional	Operación física que elimina sólidos orgánicos e inorgánicos por diferencia de densidad	Sólidos sedimentables de tipo inorgánico y orgánico	Sánchez et al., 2018 Guo et al., 2014
Desengrasado/ desaceitado	Proceso Físico que elimina grasas y aceites por la diferencia de densidad y flotación	Grasas y aceites	Sánchez et al., 2018 Guo et al., 2014

> Independiente del origen del agua residual (doméstica, no doméstica industrial y no doméstica agroindustrial), se debe realizar un tratamiento antes del vertimiento y buscar la posibilidad de re uso en diferentes sectores productivos

Etapas de tratamiento y unidades representativas	Definición	Contaminante que reducen/ eliminan	Referencia
Tratamiento secundario			
Reactores aeróbicos con biomasa en suspensión Reactor de lodos activados	Proceso biológico en presencia de oxígeno como aceptor final de electrones que utiliza diferentes comunidades microbianas en suspensión	Materia orgánica expresada como DQO, DBO5, nitrógeno orgánico, fósforo orgánico y sólidos disueltos	Guo et al., 2014 Puentes et al., 2021
Reactores aeróbicos con biomasa inmovilizadas Reactores de membrana (MBR) Reactores de lecho fluidizado	Proceso biológico en presencia de oxígeno como aceptor final de electrones que utiliza diferentes comunidades microbianas soportadas o inmovilizadas sobre diferentes soportes	Materia orgánica expresada como DQO, DBO5, nitrógeno orgánico, fósforo orgánico y sólidos disueltos	Hernández et al., 2020 Blanco et al., 2018 Martínez et al., 2019
Reactores anaeróbicos con biomasa en suspensión	Proceso biológico en ausencia de oxígeno, empleando como aceptor final de electrones compuestos como NO_3, PO_4, SO_4, CO_2 y/o H_2O que utiliza diferentes comunidades microbianas en suspensión	Materia orgánica expresada como DQO, DBO5, nitrógeno orgánico, fósforo orgánico y sólidos disueltos	Hernández et al., 2020 Blanco et al., 2018 Martínez et al., 2019
Reactores anaeróbicos con biomasa inmovilizadas	Proceso biológico en presencia de oxígeno como aceptor final de electrones que utiliza diferentes comunidades microbianas soportadas o inmovilizadas sobre diferentes soportes	Materia orgánica expresada como DQO, DBO5, nitrógeno orgánico, fósforo orgánico y sólidos disueltos	Martínez et al., 2019
Sedimentación se cundaria	Operación física que elimina sólidos orgánicos e inorgánicos (lodos microbianos) por diferencia de densidad a las salido de los reactores biológicos	Sólidos sedimentables, materia orgánica y microorganismos	Pedroza et al 2018 Pedroza y Rodríguez 2013

Etapas de tratamiento y unidades representativas	Definición	Contaminante que reducen/ eliminan	Referencia
Tratamiento terciario			
Filtración	Operación física que elimina sólidos en suspensión o disueltos, por separación diferencial de tamaño y adsorción al material filtrante	Sólidos suspendidos, sólidos disueltos, color residual y metales pesados	García et al., 2018
Coagulación/ Floculación	Proceso Físico/ químico que elimina sólidos coloidales por la modificación de la carga superficial generando sedimentación física y modificación química.	Sólidos suspendidos y sólidos disueltos	Loarte et al., 2018 Banchon et al., 2016
Remoción de nutrientes con microalgas	Operación biológica empleando microalgas o bacterias fotosintéticas en condición de luz que elimina nutrientes como nitrógeno y fósforo, presentes como iones disueltos.	Sólidos disueltos Fósforo Nitrógeno	Ardila et al., 2020 Muñiz 2019 Céspedes et al., 2021
Procesos de oxidación avanzada	Proceso físico y químico empleando especies reactivas de oxígeno, que elimina contaminantes por la oxidación no selectiva de los mismos vía radicales libres	Materia orgánica Contaminantes persistentes Microorganismos	Blanco et al., 2018; Fernández et al., 2016 Valencia et al., 2020 Puentes et al., 2021
Desinfección química	Proceso químico en el que se emplean productos como hipolorito de sodio, ácido peracético, amonios cuaternarios, entre otros que busca eliminar microorganismos	Elimina microorganismos patógenos, no patógenos e indicadores de contaminación fecal	Weber y Campos, 2016 Valencia et al., 2020

Finalmente, en cada una de las unidades que hacen parte de una planta de tratamiento se deben determinar una serie de parámetros de tipo físico, químico y microbiológico, para determinar la eficiencia parcial y global de la planta (Aghalari et al., 2020). Estos parámetros se comparan con la normatividad ambiental vigente para establecer que se cumpla con los valores máximos permisibles (MADS, 2015). De lo contrario, se deben realizar una revisión del desempeño de la planta y realizar los ajustes necesarios para mejorar la remoción en el menor tiempo posible y a bajo o mediado costo (Saravanan et al., 2021). Adicionalmente, se debe tener en cuenta que para cada sector productivo los parámetros de vertimiento pueden cambiar en función del tipo de proceso productivo y carga inicial contaminante. En la tabla 8 se presenta una clasificación resumida de los principales parámetros a monitorear.

El control de los parámetros físico-químicos y microbiológicos es muy importante tanto en los sistemas de potabilización como de depuración del agua (Saravanan et al., 2021). Sin embargo, en los lugares donde el agua es consumida por el hombre o es reutilizada, el factor de riesgo más importante está asociado con la exposición a agentes biológicos que incluyen bacterias patógenas, helmintos, protozoos y virus entéricos. El riesgo de contaminación tanto a nivel humano como ambiental hace necesario el control de la presencia de microorganismos en el agua (Some et al., 2021). Determinar el tipo de microorganismos presentes y su concentración proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas (USEPA, 2004).

Dada la dificultad de determinar la presencia de todos los patógenos y la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable, se ha planteado la necesidad de trabajar con organismos indicadores (Toribio-Avedillo et al., 2021). Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales), pero son más rápidos, económicos y fáciles de identificar. Una vez se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede deducir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador (USEPA, 2004; WHO, 2006).

Los coliformes termotolerantes (anteriormente denominados fecales) son un subgrupo de los coliformes totales, capaz de fermentar la lactosa a 44.5°C y soportar temperaturas más elevadas. Aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces, están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de Klebsiella. Ya que los coliformes termotolerantes se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Los coliformes termotolerantes y *E. coli*, presentan tasas de supervivencia semejantes a la de los patógenos entéricos (Hachich et al., 2012; Rossi et al., 2022).

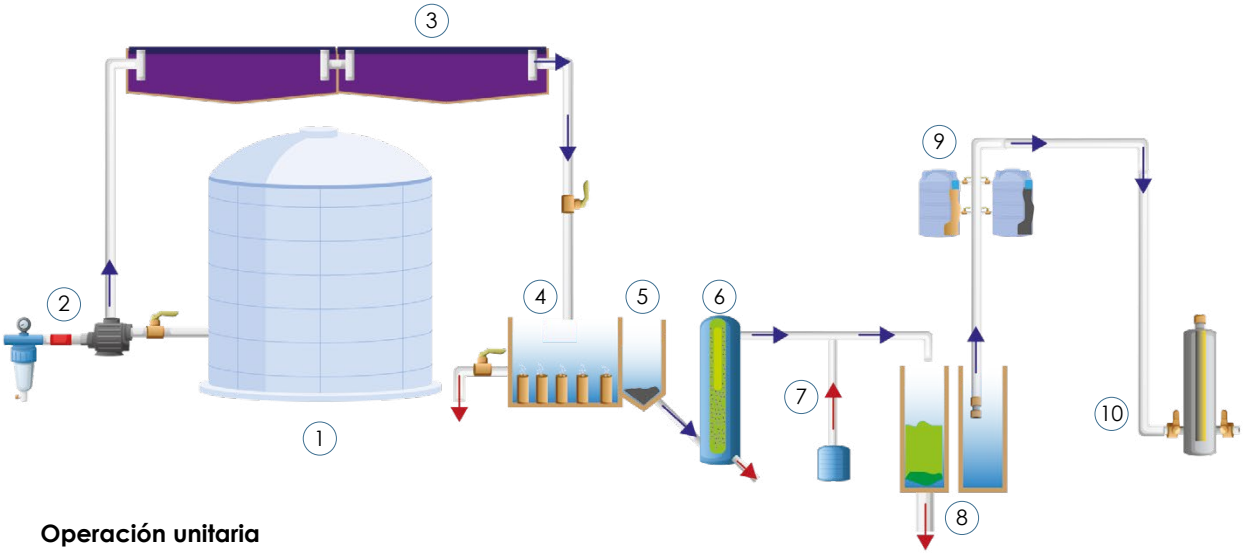
La exigencia de las normativas en cada país puede variar y en la mayoría de los casos incluyen solo el control de bacterias indicadoras como: Enterococos fecales, coliformes totales, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* (EPA US 2017). En el caso de Colombia, la normativa para aguas residuales, requiere únicamente el análisis de Coliformes termotolerantes.

> "El riesgo de contaminación tanto a nivel humano como ambiental hace necesario el control de la presencia de microorganismos en el agua."

Tabla 8.
Parámetros físicos, químicos y microbiológicos a monitorear en una planta de tratamiento para aguas residuales domésticas y no domésticas.

Tipo de agua residual	Parámetros físicos	Parámetros Químicos	Parámetros microbiológicos
Agua residual doméstica	Sólidos suspendidos totales, sólidos sedimentables	pH, demanda química de oxígeno, demanda bioquímica de oxígeno Nitratos, nitritos, ortofosfatos, detergentes Sulfuros, sulfatos, entre otros	Coliformes termotolerantes *Escherichia coli*
Agua residual no doméstica	Sólidos suspendidos totales, sólidos sedimentables, unidades de color, temperatura	pH, demanda química de oxígeno, demanda bioquímica de oxígeno Hidrocarburos, plaguicidas, explosivos Nitratos, nitritos, amonio, ortofosfatos, sulfatos, sufuros, entre otros	Coliformes termotolerantes* *Escherichia coli*

Figura 20.
El esquema de la planta de tratamiento a escala piloto.



Operación unitaria

1. Tanque de igualización
2. Sistema de bombeo
3. Trampa grasas
4. Reactor Biológico
5. Sedimentador secundario
6. Reactor foto trófico
7. Inyección de coagulante
8. Floculador
9. Sistema de filtración
10. Reactor fotocalitico

Cortesía de Lucas David Pedroza Camacho y Juan Camilo Lores Acosta.

8.2. Objetivos

Objetivo general

- Realizar el montaje y operación de una planta piloto para el tratamiento de aguas residuales no domésticas generadas al realizar tinciones biológicas en laboratorios de docencia e investigación.

Objetivos específicos

- Conocer las operaciones y procesos unitarios que se llevan a cabo en una planta piloto para el tratamiento de aguas residuales no domésticas.

- Evaluar el comportamiento de parámetros físicos, químicos y microbiológicos de control de calidad del proceso con miras a demostrar la disminución de la carga contaminante del agua residual, post tratamiento.

8.3. Materiales, medios y reactivos

8.3.1. Preparación del lodo activado fúngico/ bacteriano

- 5 erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo nutritivo (anexo A, numeral 32).

- 5 erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo extracto salvado de trigo (anexo A, numeral 9).

- 5 cajas de Petri con agar nutritivo (anexo A, numeral 2).

- 5 cajas de Petri con agar extracto salvado de trigo (anexo A, numeral 9).

- 5 cajas de Petri con agar mínimo de Bold suplementado con 1 g/L de glucosa (anexo A, numeral 33).

- Licuadora.

- Probeta de 1 L.

8.3.2. Montaje de la planta piloto pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario

- 1 tanque de igualación de 60 L.

- 1 trampa de grasas de 8 L.

- 1 reactor biológico de aireación extendida de 20 L.

- 1 sedimentador secundario de 15 L.

- 1 reactor fototrófico de 2,5 L.

- 1 reactor fotocatalítico de 3 L.

- 1 clariflocculador o floculador de 15 L.

- 1 filtro de arena cuarcítica de 8 L.

- 10 aireadores o motores de pecera.

- 2 bombas sumergibles.

- Manguera de silicona.

- Difusores porosos rectangulares de 2x10x1cm.

8.3.4. Determinación de parámetros físicos

8.3.4.1. Color verdadero y unidades de color por el método espectrofotométrico

- 1 frasco Schott de 250 mL.

- 2 tubos Falcon de 15 mL.

- 1 pipeta de 10 mL.

8.3.4.2. Determinación de sólidos suspendidos y sedimentables

- 1 filtro de fibra de vidrio de 1,58 µm.

- 1 unidad de filtración al vacío.

- 1 vaso de precipitado de 250 mL.

- Pinzas.

- Probeta de 500 mL.

- 1 cono Imhoff.

- 1 soportes para conos Imhoff.

8.3.4.3. Determinación de pH por el método potenciométrico

- 1 frasco Schott de 250 mL.
- Buffer de calibración pH 4,0 y 7,0.
- Frasco lavador.

8.3.4.4.Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) por el método de oxidación-reducción con dicromato de potasio

- 2 tubos Falcon del 15 mL.
- 1 tubo de digestión para DQO de HACH®.
- Pipeta automática de 100-1000 µL.
- Puntas plásticas para pipeta automática.

8.3.4.5.Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno por el método respirométrico

- 1 botella respirometría de 500 mL.
- 1 sensor para oxígeno disuelto.
- 1 tubo Falcon con 1 mL de solución de sales minerales A (anexo B, numeral 33).
- 1 tubo Falcon con 1 mL de solución de sulfato de magnesio heptahidratado o solución B (anexo B, numeral 34).
- 1 tubo Falcon con 1 mL de solución de cloruro de calcio o solución C (anexo B, numeral 35).
- 1 tubo Falcon con 1 mL de solución de cloruro férrico hexahidratado o solución D (anexo B, numeral 36).
- 1 tubo Falcon con 1 mL de inóculo bacteriano para DBO5 (anexo B, numeral 37).
- 1 frasco Schott de 250 mL 100 mL de agua destilada.
- 1 pipeta de 10 mL.
- 1 frasco Shcott de 25 mL con 1,5 g de KOH.
- 1 probeta de 100 mL.

8.3.4.7. Determinación de amonio (NH_4+) por el método de salicilato, nitratos y nitritos (NO_3=) por el método de reducción de Cadmio y nitritos NO_2- por el método del sulfato ferroso

- 6 tubos Falcon de 15 mL.
- 6 tubos HACH® vacíos.
- 2 sobre de NitraVer 5 HACH®.
- 2 sobre de NitriVer 3 HACH®.
- 2 sobres de reactivo salicilato de amonio HACH®.
- 2 sobres de reactivo cianurato de amonio HACH®.
- Agua desionizada.
- Pipeta automática de 100-1000 µL.
- 1 embudo plástico.
- Puntas para pipeta automática.

8.3.4.8. Determinación de sulfatos (SO_4=) por el método de sulfato de Bario

- 2 tubo Falcon de 15 mL.
- 2 tubos de reacción HACH® para la determinación de sulfatos.
- 2 sobres de SulfaVer 4 HACH®.

8.3.4.9. Determinación de ortofosfatos (PO4 3-) por el método del ácido ascórbico

- 2 tubo Falcon de 15 mL.
- 2 tubos de reacción HACH® para la determinación de ortofosfatos.
- 2 sobres de PhosVer 4 HACH®.

8.3.4.10. Análisis microbiológico para microorganismos responsables de la biotransformación o lodo fúngico/bacteriano

- Tubos de 16x150 mm tapa rosca con 9 mL de agua peptonada al 0,1 % (m/v), (anexo B, numeral 2).

•Pipeta automática de 100-1000 µL.

•7 cajas de Petri con agar nutritivo (anexo A, numeral 2).

•7 cajas de Petri con agar rosa de bengala (anexo A., numeral 34).

•5 cajas de Petri con agar mineral Bold suplementado con glucosa (anexo A, numeral 33).

•5 rastrillos de vidrio.

•Pipeta automática de 100-1000 µL.

•Puntas para pipeta automática.

8.3.4.11. Análisis microbiológico para coliformes termotolerantes por NMP. Para la determinación de los coliformes termotolerantes (fecales) se utilizan 2 métodos, basados en la técnica de NMP: Fermentación de tubos múltiples (Standard Methods 9221 E) y utilizando Colilert®-18 (sustrato definido) (US-EPA; 40 CFR Part 136 en 2017).

8.3.4.11.1. Técnica de fermentación de tubos múltiples (Standard Methods 9221 E), la identificación de los coliformes termotolerantes se basa en la capacidad de fermentar la lactosa a 44,5 °C ± 0,2 °C en 24 ± 2 h. utilizando el Caldo A1.

•5 tubos 16 x 150 mm tapa rosca y campana Durham dentro, con 10 mL de caldo A-1 a doble concentración* (anexo A, numeral 35).

•10 tubos 16 x 150 mm tapa rosca y campana Durham dentro con 10 mL de caldo A-1 a concentración sencilla.

•Pipeta automática de 100-1000 µL.

•Pipeta automática de 1-10 mL.

•Puntas para pipeta automática de 100-1000 µL y 1-10 mL.

•Gradillas.

8.3.4.11.2. Técnica de multicelda (NMP/100 mL utilizando la técnica de Colillert®

La US-EPA (US Environmental Protection Agency, Federal Register Volume 82, No. 165; 40 CFR Part 136), en 2017, aprobó la técnica de multicelda (NMP/100 mL) utilizando Colilert®-18 (sustrato definido), para la determinación de Coliformes termotolerantes.

•Agua destilada estéril (para realizar las diluciones).

•Medio sustrato definido Colilert®- 18 (anexo A, numeral 36).

•Bolsas de cuantificación Quanti-tray 2000.

•Frasco de vidrio con capacidad de 100 mL, para realizar las diluciones.

•Micropipeta de 100 a 1000 µL.

•Pipeta automática de 1 a 10 mL.

•Probeta de 100 mL.

•Puntas para micropipetas de 100 a 1000 µL.

•Puntas para pipetas automáticas de 1 a 10 mL.

8.4. Equipos

•Centrífuga.

•Termodigestor HACH®.

•Espectrofotómetro HACH®.

•Sistema de agitación para botellas respirométricas.

•Incubadora a 25,5°C ± 0,2°C para botellas respirométricas de DBO5.

•Sensor para oxígeno disuelto.

•Termobalanza.

•Espectrofotómetros UV/VIS.

•Equipo test de jarras.

•Cronómetro.

•Aireadores o motores de pecera.

- Bombas sumergibles.
- Licuadora.
- Baño termostático a 44,5 °C ± 0,2 °C.
- Autoclave.
- Vortex.
- Balanza analítica.
- Autoclave.
- Incubadora a 44,5 °C ± 0,2 °C.
- Incubadora a 20,5 °C ± 0,2 °C.
- Incubadora a 35°C ± 0,5 °C.
- Incubadora a 30 °C ± 2,0 °C.
- Sellador Quanti-trayTM Sealer Plus.

8.5. Metodología

8.5.1. Preparación del lodo activado fúngico/ bacteriano

- Retirar del congelador de -20 °C los viales de las bacterias que hacen parte del lodo activado modificado (*Pseudomonas fluorescens, Bacilluslicheniformis, Pseudomonas sp., Steptomyces sp, Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 y *Nitrosospira multiformis* ATCC 25196).
- Descongelar los viales que contienen las bacterias.
- Sembrar por aislamiento las bacterias que hacen parte del lodo bacteriano.
- Incubar 12 h a 30 °C.
- Tomar una asada de cada una de las bacterias e inocular a caldo nutritivo.
- Cultivar por 12 h a 30 °C y 120 rpm.
- Retirar del congelador de 4 °C los vialesde los hongos ligninolíticos que hacen parte del lodo activado modificado (*Pleurotus ostreatus, Trametes versicolor y Phanerochaete* sp.).
- Sembrar un disco de biomasa fúngica en agar extracto salvado de trigo.
- Incubar por 8 días a 30 °C.
- Retirar con una pipeta Pasteur invertida 5 discos de agar con micelio fúngico de la parte periférica de la caja.
- Inocular los discos en Erlenmeyer de 250 mL con caldo extracto de salvado de trigo.
- Incubar por 8 días a 30 °C y 120 rpm.
- Adicionar el contenido de todos los erlenmeyer que contienen los inóculos de bacterias y hongos en una licuadora previamente desinfectada con alcohol al 70 % (v/v) e irradiada por luz ultravioleta a 254 nm por 12 h.
- Homogenizar los cultivos por 1 minuto.
- Transferirla suspensión de microorganismos a un frasco Schott de 2 L.
- Refrigerar a 4 °C hasta el momento de inocular el reactor de lodos activados (reactor secundario).

8.5.2. Preparación del inóculo a base de Chlorella sp. para tratamiento terciario

- Retirar del congelador de -20 °C dos viales de *Chlorella* sp. que hace parte del lodo algal para tratamiento terciario.
- Descongelar los viales que contienen la microalga.
- Tomar una asada del vial y sembrar por agotamiento a *Chlorella* sp.
- Incubar 12 h a 30 °C.
- Tomar una asada del aislamiento de *Chlorella* sp. e inocular a caldo nutritivo.
- Cultivar por 4 días a 28 °C, 120 rpm y 400 Lx.

8.5.3 Montaje de la planta piloto pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario

8.5.3.1. Pretratamiento

•Recolectar en los laboratorios de docencia e investigación el agua residual no doméstica en garrafones de 20 L.

•Transferirla al tanque de igualación/ neutralización.

•Medir el pH y conductividad eléctrica inicial.

•Ajustar el pH con NaOH 1 N o HCl 1 N para obtener un valor inicial de 6,5±0,5 (anexo B, numeral 43 y 44).

•Conectar las mangueras de succión del agua residual y la bomba sumergible.

•Introducir la bomba sumergible en el agua residual.

•Conectar la manguera de succión a la trampa de grasas.

8.5.3.1. Tratamiento primario (trampa de grasas)

•Verificar que la trampa de grasas esté desocupada.

•Verificar que la manguera de succión que proviene de la bomba esté conectada al puerto de entrada de la trampa de grasas.

•Verificar que la manguera de salida y distribución de la trampa de grasas esté conectada al puerto de entrada del reactor de lodos activados modificado.

•Encender la bomba de succión para que inicie el paso del agua residual del tanque de igualación/neutralización a la trampa de grasas.

•Verificar que el agua residual está pasando por los compartimentos de la trampa de grasas a través de los deflectores que tiene la unidad.

•Verificar que el agua residual está saliendo de la trampa de grasas a través del puerto de salida y está ingresando al reactor de lodos activados modificado.

•Llenar el reactor biológico o de lodos activados con agua residual hasta completar el 80 % del volumen efectivo de trabajo con agua residual proveniente de la trampa de grasas.

•Apagar la bomba de succión cuando se complete el 80 % del volumen efectivo de trabajo.

8.5.3.3.Tratamiento secundario (reactor de lodos activados modificado)

•Verificar que los difusores de piedra porosa estén conectados a las mangueras y a los puertos de entrada para aire.

•Verificar que los aireadores están conectados a las mangueras que distribuyen el aire.

•Adicionar al reactor biológico el 80 % (v/v) de agua residual a tratar.

•Encender los aireadores a máxima capacidad.

•Adicionar por el puerto de muestreo 1 L del lodo activado modificado (consorcio fúngico/bacteriano).

•Airear y homogenizar por 5 minutos a razón de 1 L/min.

•Abrir el puerto de muestreo y tomar 0,5 L de agua residual para realizar la caracterización inicial.

8.5.3.4. Sedimentación secundaria

•Verificar que la manguera del puerto de salida del reactor biológico este conectada y colocada a la entrada del sedimentador secundario.

•Abrir la llave del puerto de salida del agua residual.

•Transferir el contenido total del reactor biológico al sedimentador secundario.

•Sedimentar los lodos activados modificados por 1 hora.

•Introducir la bomba sumergible al sedimentador secundario.

•Conectar la manguera de salida de la bomba sumergible al puerto de entrada del reactor fototrófico con microalgas (terciario).

8.5.3.5. Tratamiento terciario (microalgas)

•Verificar que los difusores de piedra porosa estén conectados a las mangueras y a los puertos de entrada para aire en el fondo del reactor fototrófico.

•Verificar que los aireadores están conectados a las mangueras que distribuyen el aire.

•Verificar que la lámpara de luz fluorescente esta conectada y colocada en la parte central del reactor fototrófico.

•Verificar que la manguera de salida de la bomba sumergible este conectada al reactor fototrófico.

•Encender la bomba sumergible.

•Adicionar al reactor fototrófico el 80 % (v/v) del efluente secundario.

•Encender los aireadores a máxima capacidad.

•Adicionar por el puerto de muestreo 1 L de microalgas.

•Airear y homogenizar por 5 minutos a razón de 1 L/min.

•Abrir el puerto de muestreo y tomar 0,5 L del efluente para realizar la caracterización inicial que ingresa a tratamiento terciario.

•Muestrear 0,5 L cada 24 o 72 h para seguir la evolución del tratamiento, o realizar únicamente un muestreo final a las 120 h aproximadamente.

8.5.3.8. Fotocatálisis con TiO_2/UV

•Transferir 2 L de efluente coagulado al reactor de fotocatálisis que contiene 10 g de TiO_2.

•Realizar el tratamiento fotocatalítico por 6 horas.

•Recuperar el efluente final y realizar la determinación de parámetros.

•Recuperar el TiO_2

8.5.3.9. Filtración con arena quarcítica

•Verificar que la manguera de la bomba sumergible esté conectada a la entrada del filtro de arena

•Filtrar el 90% del efluente que sale del reactor de fotocatálisis.

•Abrir el puerto de salida del filtro de arena.

•Recuperar el efluente final para realizar la caracterización final y reutilizarlo como agua de riego para zonas verdes y jardines.

8.5.4. Determinación de parámetros físicos de control de proceso

8.5.4.1. Determinación de color verdadero y unidades de color

•Tomar 10 mL del agua residual y transferirlos a un tubo falcón de 15 mL.

•Colocarlos en la centrífuga y nivelar con un tubo con igual peso. Centrifugar 15 minutos a 5000 rpm.

•Transferir el sobrenadante a un tubo Falcón limpio.

•Encender el espectrofotómetro y dejar calibrar.

•Realizar barrido UV/VIS para determinar la longitud de onda de máxima absorción.

•Ajustar el espectrofotómetro a la longitud de onda máxima absorción.

•Ajustar el blanco con agua destilada.
•Leer la absorbancia de la muestra de agua residual inicial.

•Si la absorbancia es superior a una absorbancia de 1,0, realizar la dilución correspondiente con agua destilada.

•Convertir la absorbancia a unidades de color empleando la ecuación 21. (Livernoche et al., 1983; Hernández et al., 2020).

$$UC = \frac{ABS\ X\ 500}{0.132}\ UC = \frac{ABS\ X\ 500}{0.132}$$

(Ecuación 21)

Convertir las UC a porcentaje de decoloración empleando la ecuación 22. (Livernoche et al., 1983; Hernández et al., 2020).

$$\%\ Decoloración = \frac{uci-ucf}{uci}\ X\ 100$$

(Ecuación 22)

Donde: UCi: Unidad de color inicial. UCf: Unidad de color final.

•Realizar el mismo procedimiento a la muestra que ingresa a la planta de tratamiento, a la salida de cada unidad de tratamiento y al final tratamiento terciario.

8.5.4.2. Determinación de sólidos

8.5.4.2.1. Sólidos suspendidos totales

•Tomar 50 mL del agua residual inicial, del reactor biológico y transferir a un frasco Schott de 250 mL.

•Homogenizar por inversión el contenido del frasco Schott.

•Pesar el filtro de fibra de vidrio en balanza de tres dígitos.

•Colocar el filtro con pinzas en el sistema de filtración al vacío de 500 mL.

•Tapar el sistema de filtración al vacío.

•Conectar la manguera a la bomba de vacío.

•Adicionar 20 o 50 mL del agua residual.
•Encender la bomba de vacío y dejar pasar la totalidad del agua residual.

•Destapar el sistema de filtración.

•Retirar con las pinzas el filtro de fibra de vidrio.

•Colocarlo en el porta muestras de la balanza de tres dígitos.

•Evaporar el agua por 5 minutos a 105 °C.

•Registrar el peso final del filtro seco y con los sólidos suspendidos totales.

•Calcular los mg/L de sólidos suspendidos totales empelando la ecuación 23.

$$Sólidos\ suspendidos\ totales\ \frac{mg}{L} = \frac{Pff-pffi}{10\ o\ 20\ mL}\ X\ 1000$$

(Ecuación 23)

Donde: Pfi: Peso en mg del filtro inicial. Pff: Peso final en mg del filtro con los sólidos después de evaporar.

8.5.4.2.2. Sólidos sedimentables

•Tomar 1 L del agua residual inicial del reactor biológico.

•Transferir a un cono Imhoff de 1 L.

•Colocar el cono en el soporte metálico.

•Sedimentar por 1 hora.

•Determinar los mL/L de sólidos sedimentables midiendo los mL de sólidos desde la base del cono Imhoff hasta donde se observe con claridad la columna de sólidos.

8.5.5. Determinación de parámetros químicos

8.5.5.1. Determinación de pH

•Tomar 50 mL del agua residual y colocarlos en un frasco Schott de 250 mL.

•Introducir el sensor de pH previamente calibrado.

•Registrar el valor de pH del agua residual.

•Retirar el electrodo y lavar con agua destilada.

•Colocar el protector plástico del sensor de pH.

•Apagar el equipo.

8.5.5.3. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) por el método de reflujo cerrado y oxidación con dicromato de potasio, ácido sulfúrico y temperatura

- Transferir 10 mL de agua residual a un tubo Falcon de 15 mL.
- Centrifugar por 10 minutos a 5000 o 1000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un tubo falcon limpio de 15 mL.
- Tomar 0,2 o 2 mL del agua residual centrifugada, transferir al tubo HACH®.
- Seguir las instrucciones de la casa comercial para el método No 8000 (https://co.hach.com/).
- Leer la concentración de la demanda química de oxígeno (mg/L DQO) en el espectrofotómetro HACH®.

8.5.4.5. Determinación de la Demanda bioquímica de oxígeno al quinto día (DBO5) por el método respirométrico al quinto día

- Transferir 10 mL de agua residual a un tubo Falcon de 15 mL.
- Centrifugar por 10 minutos a 5000 o 1000 rpm.
- Transferir los 10 mL de agua a la botella respirométrica.
- Adicionar 90 mL de agua destilada para tener una dilución 1/10.
- Adicionar 0,1 mL de solución A.
- Adicionar 0,1 mL de solución B.
- Adicionar 0,1 mL de solución C.
- Adicionar 0,1 mL de solución D.
- Adicionar 0,1 mL de inóculo bacteriano para DBO5.
- Colocar la barra magnética dentro de la botella respirométrica.
- Colocar el recipiente de caucho en la boca de la botella.
- Colocar 1 g de KOH.
- Colocar el sensor de DBO_5 y cerrar suavemente.
- Programar el sensor para el rango de altas (999 mg/L).
- Colocar las botellas en el agitador magnético para DBO_5.
- Incubar las botellas en agitación por 5 días.
- Registrar la concentración de DBO_5 al quinto día y multiplicar por el inverso de la dilución realizada.

8.5.4.6. Determinación de nitrógeno, amoniacal, nitratos y nitritos

8.5.4.6.1. Determinación de nitrógeno amoniacal por el método del método de salicilato

- Transferir 10 mL de agua residual a un tubo Falcon de 15 mL.
- Centrifugar por 10 minutos a 5000 o 1000 rpm.
- Realizar una dilución con agua MilliQ con un volumen final de 10.
- Transferir 10 mL de sobrenadante a un tubo falcon limpio de 15 mL.
- Transferir los 10 mL de agua residual a un tubo HACH® vacío.
- Seguir las instrucciones de la casa comercial para el método No 8155 (https://co.hach.com/).
- Leer la concentración de nitrógeno amoniacal (mg/L NH_3-) en el espectrofotómetro HACH®.

8.5.4.6.3. Determinación de nitratos por el método de reducción de Cadmio

- Transferir 10 mL de agua residual a un tubo Falcon de 15 mL –realizar este procedimiento por duplicado.
- Centrifugar por 10 minutos a 5000 o 1000 rpm.

•Transferir los 10 mL de agua residual a un tubo HACH® vacío.

•Seguir las instrucciones de la casa comercial para el método No 8039 (https://co.hach.com/).

•Leer la concentración de nitratos (mg/L NO_3-) en el espectrofotómetro HACH®.

8.5.4.6.4. Determinación de nitritos por el método del sulfato ferroso

•Transferir 10 mL de agua residual a un tubo Falcon de 15 mL

•Realizar este procedimiento por duplicado.

•Centrifugar por 10 minutos a 5000 o 1000 rpm.

•Transferir los 10 mL de agua residual a un tubo HACH® vacío.

•Seguir las instrucciones de la casa comercial para el método No 8153 (https://co.hach.com/).

•Leer la concentración de nitritos (mg/L NO_2-) en el espectrofotómetro HACH®.

8.5.4.7.Determinación de sulfatos por el método del sulfato de Bario

•Transferir 10 mL de agua residual a un tubo Falcon de 15 mL –realizar este procedimiento por duplicado.

•Centrifugar por 10 minutos a 5000 o 1000 rpm.

•Transferir los 10 mL de agua residual a un tubo HACH® vacío.

•Seguir las instrucciones de la casa comercial para el método No 8051 (https://co.hach.com/).

•Leer la concentración de sulfatos (mg/L SO_4-) en el espectrofotómetro HACH®

8.5.4.8. Determinación de ortofosfatos por el método del ácido ascórbico

•Transferir 10 mL de agua residual a un tubo Falcon de 15 mL –realizar este procedimiento por duplicado.

•Centrifugar por 10 minutos a 5000 o 1000 rpm.

•Transferir los 10 mL de agua residual a un tubo HACH® vacío.

•Seguir las instrucciones de la casa comercial para el método No 8048 (https://co.hach.com/).

•Leer la concentración de ortofosfatos (mg/L PO_4^{-3}) en el espectrofotómetro HACH®.

8.5.5. Análisis microbiológico para los microorganismos responsables de la biotransformación o consorcio fúngico/ bacteriano

•Tomar 5 mL de muestra en un tubo 16x150 mm.

•Agitar la muestra en vortex por 10 segundos y tomar 1 mL.

•Transferir 1 mL de muestra a un tubo 16x150 mm con 9 mL de solución salina o agua peptonada. (0,80 % m/v). Obteniendo un factor de dilución 1/10.

•Realizar diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-12}.

•Transferir y sembrar por superficie en agar salvado de trigo o agar rosa de bengala 0,1 mL de las diluciones 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} y 10^{-8} para recuento de hongos de podredumbre blanca.

•Transferir y sembrar por superficie en agar nutritivo 0,1 mL de las diluciones 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} y 10^{-8} para recuento de bacterias.

•Transferir y sembrar por superficie en agar nutritivo 0,1 mL de las diluciones 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} y 10^{-8} para recuento de microalgas.

•Invertir las cajas de Petri y envolverlas en vinipel.

•Incubar las cajas de recuento de hongos por 7 días a 30 °C.

•Incubar las cajas de recuento bacteriano por 48 horas a 30 °C.

• Realizar el conteo de unidades formadoras de colonia utilizando la ecuación 24.

$$UFC/mL = \frac{UFC\ X\ IFD}{0,1\ mL}$$

(Ecuación 24)

Donde: UFC: unidad formadora de colonia. IFD: inverso factor de dilución.

8.5.6. Análisis microbiológico para coliformes termotolerantes por NMP: Técnica de Fermentación de tubos múltiples (Standard Methods 9221 E)

• Retirar la muestra de la nevera y dejar a temperatura ambiente.

• Tomar la muestra y agitar vigorosamente 25 veces.

• Si es necesario realizar diluciones seriadas, para ello tenga en cuenta el aspecto de la muestra: Color, turbiedad, olor y sólidos.

• Proceder a preparar las diluciones teniendo en cuenta los siguientes procedimientos.

• Diluciones seriadas salteadas pares:

• Agitar muy bien la muestra. Realice el análisis de la muestra en Cabina de Bioseguridad o en un área aséptica.

• Para preparar una dilución de 10^{-1}, tomar 10 mL de muestra y adicionarlos a 90 mL de agua destilada estéril (frasco de dilución con 90) agitar muy bien.

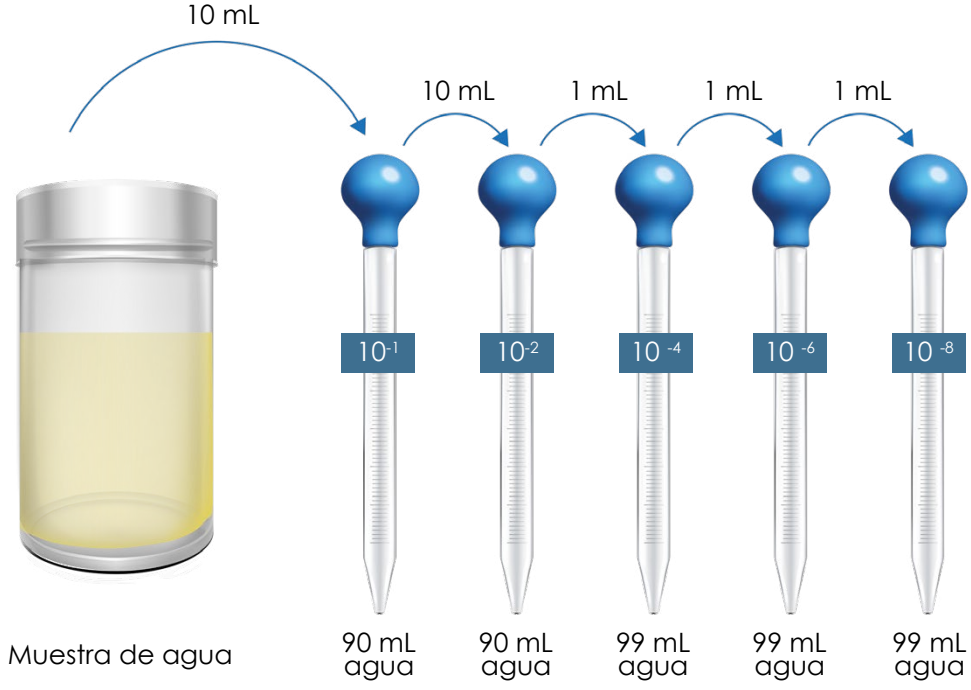
• Si la dilución siguiente es seriada par, es decir 10^{-2}, tomar 10 mL de la dilución anterior, transfiéralos a otro frasco con 90 mL de agua destilada estéril, agitar muy bien.

• Para dilución de 10^{-4}, tome 1 mL de la dilución anterior y llevarlo a un frasco con 99 mL de agua destilada.

• Para dilución de 10^{-6}, tome 1 mL de la dilución anterior y llévelo un frasco con 99 mL de agua destilada y así sucesivamente (Figura 21).

• Al realizar cada dilución cambiar de punta la pipeta.

Figura 21.
Diluciones seriadas salteada pares



•Diluciones seriadas salteadas impares:

•Para las diluciones saltadas impares tomar 10 mL de muestra, transfiéralos a 90 mL de agua destilada estéril, obteniendo una dilución de 10^{-1}, agitar muy bien.

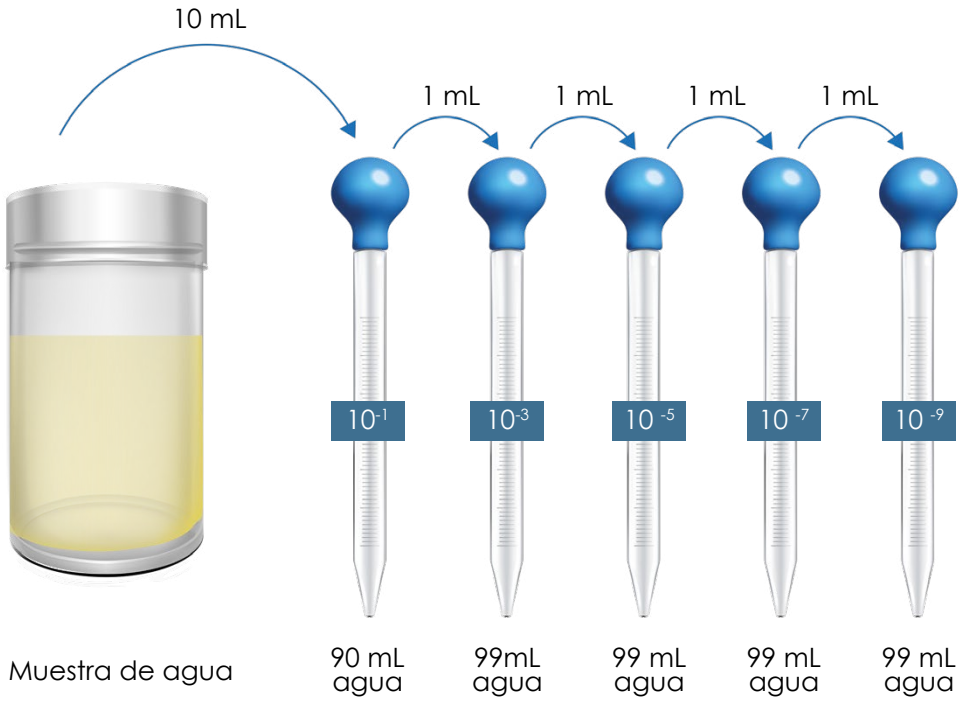
•Tomar 1 mL de esa dilución (10^{-1}) y adicionarlos a 99 mL de agua destilada estéril, obteniendo una dilución de 10^{-3}, agitar muy bien.

•Para la dilución 10^{-5} tomar 1 mL de la anterior y llevarlo a un frasco con 99 mL de agua destilada estéril.

•Para la dilución 10^{-7} tomar 1 mL de la anterior y llevarlo a un frasco con 99 mL de agua destilada estéril, y así sucesivamente (Figura 22).

•Al realizar cada dilución cambiar de punta la pipeta.

Figura 22.
Diluciones seriadas salteada impares.



•Inocular los volúmenes de muestra según se indica en la siguiente tabla:

Tabla 9.
Volumen de muestra por serie de tubos para análisis de coliformes termotolerantes

Serie	Volumen de muestra en mL	Concentración del medio	N° de tubos por serie
1	10	Doble	5
2	1	Simple	5
3	0,1	Simple	5

•Incubar los tubos de caldo A-1 inoculados a 35 ± 0,5 °C por 3 horas (usar incubadora).

•Pasado el tiempo, transferir los tubos de caldo A-1 al baño termostatado a 44,5 ± 0,2°C por 21 ± 2 horas.

•Interpretación de resultados.

•Verificar la producción de gas en los tubos de caldo A-1, la reacción positiva corresponde a presencia de Coliformes termotolerantes (fecales).

•Para estimar la densidad de coliformes termotolerantes, calcular el valor de NMP a partir del número de tubos positivos de acuerdo con la tabla de Números Más Probable del Standard Methods for the examination of water & wastewater, 23rd Edition (SM) 9221 C: Tabla 9221: IV. (Anexo C, numeral 1).

•Realice la conversión de las unidades con las ecuaciones 25 y 26:

$$\text{Coliformes termotolerantes } \frac{NMP}{100\ mL} = \frac{10\ X\ NMP\ (Tabla\ 922{:}IV)}{Factor\ de\ dilución}$$

(Ecuación 25)

$$\text{Coliformes termotolerantes } \frac{NMP}{mL} = \frac{\frac{NMP}{100\ mL}}{100}$$

(Ecuación 26)

Donde: NMP: Número Más Probable. mL: mililitro

8.5.7. Análisis microbiológico para coliformes termotolerantes por NMP: por la técnica de multicelda (NMP/100 mL) utilizando el sustrato definido Colilert®-18.

•Agitar muy bien la muestra, y proceder a preparar las diluciones teniendo en cuenta los siguientes procedimientos descritos anteriormente (Figuras 21 y 22).

•A la dilución a sembrar adicionar el contenido total de un vial (o sachet/ ampolleta/paquete) de Colilert®-18 y agitar hasta que el sustrato se disuelva totalmente.

•Tomar las bolsas Quanti-tray, separar un poco el recubrimiento halando la pestaña de la parte superior y verter dentro de la bolsa todo el contenido del frasco de dilución que contiene el sustrato (100 mL).

•Encender previamente el sellador Quanti-tray Sealer PLUS, y dejarlo calentar hasta que la luz verde se encienda.

•Colocar la bolsa Quanti-tray que contiene la muestra en la plantilla de caucho correspondiente y pasarlo a través del sellador, este distribuye la muestra homogéneamente en todas las celdas, y sella la bandeja automáticamente.

•Incubar las bolsas de quanti-tray a 44,5 ± 0,2°C durante 18 ± 2 horas.

•Pasado el tiempo de incubación realizar el conteo de las celdas en las que la solución presenta color amarillo e informar Coliformes Termotolerantes.

•Leer los resultados de acuerdo con la tabla 10 y la figura 23:

Tabla 10.
Interpretación de resultados para Colilert®

Aspecto	Resultado
Menos amarillo que el comparador	Negativo para coliformes termotolerantes
Amarillo igual o mayor que el comparador	Positivo para coliformes termotolerantes

Figura 23.

Cuantificación de Coliformes termotolerantes por el método sustrato enzimático Colilert® - 18, formato multicelda (utilizando la cepa de Klebsiella variicola ATCC 31488).



Cortesía de: Fidson-Juarismy Vesga.

•Cálculos

•Calcular el NMP de Coliformes termotolerantes a partir del número de celdas positivas de acuerdo con la tabla de Número Más Probable (anexo C, numeral 2) o utilizando el Software generador de NMP proporcionados por el fabricante.

•Si ha realizado dilución a la muestra tenga en cuenta el factor de dilución vertida en la bolsa.

•Reporte los resultados obtenidos como NMP/100 mL.

8.5.Referencias

Aghalari, Z., Dahms, H., Sillanpaa, M., et al. (2020). Effectiveness of wastewater treatment systems in removing microbial agents: asystematic review. Globalization and Health. https://doi.org/10.1186/s12992-020-0546-y.

Ahmad, J., Naeem, S., Ahmad, M., et al. (2019). A critical review on organic micropollutants contamination in wastewater and removal through carbon nanotubes. Journal of Environmental Management. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.152.

American Public Health Association A, American Water Works Association A, Water Environment Federation W (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st edn. Washington DC., USA.

Ardila, L., Hernández, V., Céspedes, D., Mateus, F., Rivera, C., Pedroza, L., y Quevedo, B. (2020) Tertiary treatment (Chlorella sp.) of a mixed effluent from two secondary treatments (immobilized recombinant P. pastoris and rPOXA 1B concentrate) of coloured laboratory wastewater (CLWW). Biotech. 10(5), 233-233.

Banchón, C., Baquerizo, R., Muñoz, D., y Zambrano, L. (2016). Coagulación natural para la descontaminación de efluentes industriales. Enfoque UTE. 7(4), 111-126.

Blanco, A., Ramírez, C., Duarte, M., Beltrán, M., Medina, L., Florido, A., y Pedroza, A. (2018). A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO2. Universitas Scientiarum. 23(3), 437-464.

Campos, C., Saconi, A., (2014). Gestión del agua en América del Sur: el estado de los recursos hídricos en Argentina, Brasil y Colombia. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana.

Céspedes-Bernal, DN., Mateus-Maldonado, JF., Rengel-Bustamante, JA., Quintero-Duque, MC., Rivera-Hoyos, CM., Poutou-Piñales, RA., Díaz-Ariza, LA., Castillo-Carvajal, LC., Páez-Morales, AI., Pedroza-Rodríguez, AM. (2021) Non-domestic wastewater treatment with fungal/bacterial consortium followed by Chlorella sp., and thermal conversion of the generated sludge. 3 Biotech. 11, 227. https://doi.org/10.1007/s13205-021-02780-1

Che, P., Zhao, W., Chen, D., et al. (2022). Research Progress on Integrated Treatment Technologies of Rural Domestic Sewage: A Review. Water. https://doi.org/10.3390/w14152439.

EPA US. 2017. Clean Water Act Methods Update Rule for the Analysis of Effluent. Rules and Regulations; 40 CFR Part 136. Fed Regist 2017; 82:165).

EPA. (2020). Title 40 of the Code of Federal Regulations. Protection of the Environment. 40 C.F.R. 141. Journal of Microbiology. 675-681. Recuperado de: http://www.ecfr.gov/cgibin/textidx?SID=1b93484e698f66515776074457ec1b&tpl=/ecfrbrowse/Title40/40tab_02.tp1

Fernández, J., Suan, A., Ramírez, J., Robles, J., Salcedo, J., Pedroza, A., Daza, C. (2016). Treatment of real wastewater with TiO2-films sensitized by a natural-dye obtained from Picramnia sellowii. Journal of environmental chemical engineering. 4(3), 2848-2856.

García, A., Pascual, J., Muñoz, M., y Capilla, J. (2018). Eliminación de fármacos en el agua residual urbana mediante la combinación de biorreactores de membranas con procesos de oxidación avanzada calidad del agua tratada para su reutilización: mejora de la calidad del agua tratada para su reutilización. In Congreso Nacional del Agua Orihuela: Innovación y Sostenibilidad. 937-948. Universitat d´ Alacant/ Universidad de Alicante.

Guo, T., Englehardt, J., Wu, T. (2014). Review of cost versus scale: water and wastewater treatment and reuse processes. Water Science and Technology. 69(2), 223-234.

HACH (2022a) HACH 8051, Sulfate. Barium sulfate method. HACH Company.

HACH (2022b) HACH 8153, Nitrite. Sulphate Ferrosous method. HACH Company.

HACH (2022c) HACH 8000, Chemical oxygen demand. Reactor digestion method. HACH Company.

HACH (2022d) HACH 8155, Ammonia (Nitrogen). Salicylate method. HACH Company.

HACH (2022e) HACH 8039, Nitrate. Cadmium reduction method. HACH Company.

HACH (2022f) HACH 8048, Ortophosphate. Ascorbic Acid method. HACH Company.

Hachich, EM., Di-Bari, M., Christ, AP., Lamparelli, CC., Ramos, SS., Sato, MI. (2012). Comparison of thermotolerant coliforms and Escherichia coli densities in freshwater bodies. Brazilian Journal of Microbiology. 675-681.

Hernández-Sáenz, D., Puentes-Morales, CS., Mateus-Maldonado, JF., Pedroza-Camacho, LD., Ramírez-Rodríguez, J., Rivera-Hoyos, CM., Pedroza-Rodríguez, AM. (2020). Evaluación de un consorcio entre Pleurotus ostreatus, Trametes versicolor y bacterias aeróbicas para la remoción de colorantes sintéticos. Revista Colombiana de Biotecnología. 22. (1), 45-59.

Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M., Dorica, J. (1983) Removal of color from Kraft mill wastewater with cultures of white rot fungi and with immobilized mycelium of Coliorus versicolor. Biotechnology Bioengineering. 24(8), 2055–2065.

Loarte, M., Castañeda, EM. (2018). Evaluación del sistema de tratamiento de aguas residuales de las lagunas de oxidación de la ciudad de casma-2017. UCV-Scientia. 57-57.

Martínez, M., Serrano, B., García, L., Miñana, G. (2019). Tratamiento coste-efectivo de activación medioambiental para disfunciones del sistema biológico de las EDAR. In XXXV Jornadas Técnicas de AEAS (pp. 682-685). Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento.

Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. 2018. resolución 0883 del 2018, Bogotá Colombia.

Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. 2018. resolución 0631 del 2016, Bogotá Colombia

Muñiz, R. (2019). Los fotobiorreactores de microalgas: Un recurso para el tratamiento terciario de aguas residuales. Tekhné. 22(3).

Organización Mundial de la Salud (oms). (1989). Directrices sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
Pedroza, A., Rodríguez, R., (2013). Optimization of C/N ratio and inducers for wastewater paper industry treatment using Trametes versicolor immobilized in bubble column reactor. Journal of Micology. 1, 1-11.

Pedroza, L., Lores, J., Rojas, J., Mateus, J., Puentes, C., Ramírez, J., Pedroza., A. (2018). Effect of Domestic Wastewater as Co-Substrate on Biological Stain Wastewater Treatment Using Fungal/Bacterial Consortia in Pilot Plant and Greenhouse Reuse. Journal of Water Resource and Protection. 10(3), 369-393.

Puentes-Morales, C., Pedroza-Camacho, LD., Mateus-maldonado, JF., Lores-Acosta, JC., Pedroza-Cubides, MC., Ramírez-Rodríguez, J., Salcedo-Reyes, JC., Díaz-Ariza, LA., Pedroza-Rodríguez, AM. (2021) Biological and photocatalytic treatment at pilot plant scale of synthetic coloured wastewater produced in university teaching laboratories. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 20(2), 521-539. https://doi.org/10.24275/rmiq/IA1997.

Ramírez, A., Zoila, E., Rivera-Paima, C. (2019). Remoción de Cr3+ en el tratamiento terciario de efluentes de curtiembre mediante nanofiltración.

Rivera, P., Chávez, R., y Salinas, R. (2018). Avances y limitantes en el tratamiento del agua residual del estado de Zacatecas. Tecnología y ciencias del agua. 9(1), 113-123.
Rossi, E., Luft, S., Moehle, J., et al. (2022). Chlorine Efficiency in the Reducing Coliforms in the Sanitary Effluent of Septic Tank Treatment Systems with Anaerobic Filter. Journal of Advances in Microbiology. DOI: 10.9734/JAMB/2022/v22i230433.

Sánchez, MB., Uribe, C. (2018). Contaminación de los ambientes acuáticos generados por la industria textil. Revista Campus. 23(26).

Saravanan. A., Kumar, S., Jeevanantham, S., et al. (2021). Effective water/wastewater treatment methodologies for toxic pollutants removal: Processes and applications towards sustainable development. Chemosphere. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130595.

Some, S., Mondal, R., Mitra, D., et al. (2021). Microbial pollution of water with special reference to coliform bacteria and their nexus with environment. Energy Nexus. https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100008.

Thanigaivel, S., Priya, A.K., Gnanasekaran, L., et al. (2022). Sustainable applicability and environmental impact of wastewater treatment by emerging nanobiotechnological approach: Future strategy for efficient removal of contaminants and water purification. Sustainable Energy Technologies and Assessments. https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102484.

Toribio-Avedillo, D., Blanch, A., Muniesa, M., et al. (2021). Bacteriophages as Fecal Pollution Indicators. https://doi.org/10.3390/v13061089.

USEPA (2004), Guidelines for Water Reuse. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Valencia, CL., Pedroza-Rodríguez, AM., Chamorro-Tobar, IC., Zambrano, DC., Carrascal-Camacho, AK. (2020). Evaluation of photolysis, photolysis/H2O2 and H2O2 as treatments for the reduction of Salmonella spp in water of pig farms. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 31(4), e17205

Véliz-Flores, RR., Aronés-Medina, EG., Palomino-Malpartida, YG., Huincho-Rodríguez, R. (2018). Desinfección del efluente secundario de la planta de agua residual de Ayacucho con radiación ultravioleta para su reutilización en riego agrícola. Revista de la Sociedad Química del Perú. 84(1), 41

Weber, B., Campos, C. (Eds.). (2016). Aportes técnicos y formativos para el uso sostenible de los recursos hídricos en América Latina. Editorial Pontificia Universidad Javeriana.

WHO (2006) Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater. Volume 2: Wastewater Use in Agriculture. World Health Organization, Geneva).



Capítulo 9

BACTERIÓFAGOS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN ACUÁTICA



Capítulo 9

BACTERIÓFAGOS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN ACUÁTICA

Campos-Pinilla C.

9.1. Introducción

El riesgo de contaminación tanto a nivel humano como ambiental hace necesario el control de la presencia, concentración y viabilidad de microorganismos patógenos en el agua. Dicho control proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones con relación al control de vertidos, tratamiento de aguas, conservación de los ecosistemas y salud pública (Campos, 1999, Lucena et al., 2003; Toriribio et al., 2021).

El control de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos es muy importante tanto en los sistemas de potabilización como en los de depuración del agua. Sin embargo, en los lugares donde el agua es consumida por el hombre o es reutilizada, el factor de riesgo más importante está asociado con la exposición a agentes biológicos que incluyen bacterias, virus protozoos y helmintos (Asano y Levine, 1998, García-Aljaro et al., 2018; Toriribio et al., 2021).

Existe un consenso general sobre la dificultad de determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos implicados en los procesos de contaminación ambiental ya que implica varios días de análisis, costos elevados y laboratorios especializados. Frente a estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con microorganismos indicadores (Campos, 1999, Savichtcheva y Okabe, 2006; Toriribio et al., 2021).

> La evaluación de los patógenos presentes en agua, se ha realizado tradicionalmente por medio de indicadores bacterianos como coliformes totales y *E. coli*.

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción similar frente a factores ambientales y barreras artificiales), pero son más rápidos económicos y fáciles de identificar. Una vez se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en concentraciones parecidas y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador.

La evaluación de los patógenos presentes en agua, se ha realizado tradicionalmente por medio de indicadores bacterianos como coliformes totales y *E. coli*. Sin embargo, se ha determinado que los virus y parásitos son más resistentes a las condiciones ambientales y a sistemas de desinfección por lo que es necesario incluirlos dentro del seguimiento y control de la calidad del agua.

Más de 140 virus pueden ser transmitidos al hombre a través del agua. Estos son los virus entéricos eliminados a través de las heces de las personas infectadas. Desde el punto de vista de la salud pública, los virus entéricos son el grupo de microorganismos patógenos más críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja, son muy resistentes a los sistemas de desinfección y el control a nivel de laboratorio es costoso (Campos, 2019, Schwartzbrod, 1995; Wescot y Ayres, 1990; Toriribio et al., 2021).

En el caso de los virus se pueden detectar enterovirus mediante el uso de técnicas que requieren algunas veces de periodos prolongados de tiempo e infraestructura y costos altos. De igual forma se sabe que algunos virus son más resistentes a la desinfección que el grupo de los coliformes, por lo que los indicadores tradicionales de contaminación bacteriana no evalúan de manera eficiente la presencia o ausencia de virus en el agua. Frente a esta dificultad se presenta la alternativa del uso de los bacteriófagos como indicadores de la presencia de virus patógenos de origen fecal. Se han estudiado varios grupos de bacteriófagos que infectan bacterias entéricas como son los colifagos somáticos, F específicos y fagos que infectan cepas de *Bacteroides fragilis* (IAWPRC, 1991, Jofre et al., 2016; Toriribio et al., 2021).

Existen varias aplicaciones de los bacteriófagos como indicadores. Estas incluyen su uso como indicadores de contaminación por patógenos en aguas residuales, eficiencia del tratamiento en plantas potabilizadoras y depuradoras y supervivencia de virus y bacterias entéricas en el ambiente.

Las condiciones que cumplen los bacteriófagos para ser propuestos como indicadores virales de origen fecal son las siguientes:

- Los fagos se encuentran abundantemente en agua residual y agua contaminada.
- Las poblaciones de fagos son mucho más grandes que las de los enterovirus y por consiguiente más fáciles de recuperar a nivel ambiental.
- Los fagos son incapaces de reproducirse fuera del huésped bacteriano.
- Los fagos se pueden aislar y contar usando métodos sencillos.
- Se obtienen resultados más rápidos cuando se analizan los fagos que cuando se trabaja con enterovirus.
- Ciertos fagos son tan resistentes como los enterovirus a los procesos de desinfección (Schwartzbrod, 1995).

Los bacteriófagos difieren de los organismos celulares en que son más pequeños (20-100 nm de diámetro) y presentan pocos

tipos de macromoléculas. Generalmente contiene solo una capa proteica que rodea un núcleo de DNA o RNA. Algunos fagos también contienen lípidos y son parásitos intracelulares obligados por lo que requieren de la presencia de una bacteria huésped viable para su replicación. En muchos casos la replicación del fago lleva a la lisis o muerte de la célula huésped.

Se ha encontrado que varios factores pueden influir en el número y la actividad de los bacteriófagos. Estos incluyen la densidad tanto de la célula huésped como del fago correspondiente, la asociación de los fagos y bacterias con los sólidos, la presencia de materia orgánica, especialmente aquella que influye en la actividad metabólica del huésped bacteriano; la luz ultravioleta y la visible; temperatura; pH y la concentración y el tipo de iones (Farrah, 1995, Grabow, 2001; Toriribio et al., 2021).

En la mayoría de los estudios acerca de la distribución de los fagos en ambientes acuáticos, la cepa de *E. coli,* ha sido usada como bacteria huésped. De ahí el uso generalizado de los colifagos como indicadores de virus entéricos. Los colifagos han sido aislados de lagos, ríos y otros ambientes acuáticos en varias partes del mundo, en concentraciones que superan 10^5 a 10^7/L.

Los fagos somáticos tienen una cápside con DNA de cadena doble o sencilla en su genoma. Se unen a los lipopolisacáridos o los receptores proteicos en la pared celular bacteriana y pueden causar lisis en la cepa huésped en 20 - 30 minutos en condiciones óptimas. Son conocidos más comúnmente como colifagos somáticos y pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Sipoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae* (Muniesa et al., 1999, Jebri et al., 2017; Toriribio et al., 2021).

Algunos estudios se han enfocado en los fagos F RNA específicos en aguas residuales ya que se han propuesto como indicadores de contaminación fecal. Se encuentran en concentraciones de 10^4 y 10^7 PFP/L, usando como cepa huésped *Escherichia coli* o *Salmonella typimurium* (Bitton, 1995). El sitio receptor de estos fagos para la infección es el pili sexual que sólo se produce a temperaturas entre 32 y 40°C, lo que implica que este fago no puede replicarse en ambientes naturales y son específicos de contaminación de origen fecal. Los fagos RNA específicos de la familia *Leviviridae* contiene dos géneros (*Levivirus* y *Allolevirus*) y tres grupos no clasificados (Muniesa et al., 1999, Jebri et al., 2017).

Los fagos que infectan varias cepas de especies de *Bacteroides*, han sido detectados en heces y aguas contaminadas con heces. La gran mayoría de estos fagos pertenecen a la familia *Siphoviridae*, infectan la bacteria por la pared y se consideran fagos somáticos. Las cepas de *Bacteroides* también difieren en su capacidad de detectar fagos en las heces de diferentes especies de animales, incluyendo humanos y de aquí su habilidad para determinar el origen de la contaminación en una muestra dada. Su concentración en ambientes acuáticos naturales es generalmente más baja que la de los fagos F RNA específicos y la de los somáticos ya que son excretados en bajas concentraciones en alrededor del 15% de los humanos. Teniendo en cuenta que la célula huésped es anaerobia estricta y que se puede presentar interferencia por contaminación con otras bacterias, el recuento de estos fagos puede ser un poco más complicado (Grabow et al., 1999; Jebri et al., 2017).

“Algunos fagos también contienen lípidos y son parásitos intracelulares obligados por lo que requieren de la presencia de una bacteria huésped viable para su replicación. En muchos casos la replicación del fago lleva a la lisis o muerte de la célula huésped.”

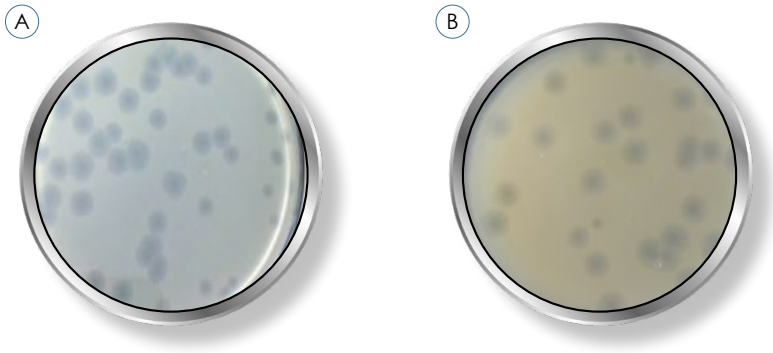
Los fagos se evalúan generalmente sin realizar métodos de concentración directa con su respectiva bacteria huésped, por medio de una doble capa en agar. Los métodos para la detección y enumeración de colifagos somáticos han sido estandarizada por ISO 10705-2 (Anonymous, 2000), para fagos F RNA específicos, ISO 10705-1 (Anonymus, 1995) y para fagos que infectan cepas de *Bacteroides fragilis*, ISO 10705-4 (Anonymus, 2001). La técnica consiste en mezclar una cepa huésped conocida con una muestra de agua donde se presume están los fagos que infectan dicha cepa huésped. Si ocurre la infección se realizará la fase lítica y se observarán placas de lisis. Las diferencias en los protocolos mencionados según el fago a analizar se observan en la tabla 11.

Los fagos se pueden detectar tanto en aguas contaminadas como en aquellas que no deben presentar contaminación de origen fecal (aguas potables) o es muy baja (Figura 24). Para el caso de las aguas residuales se realiza una previa filtración para eliminar las bacterias acompañantes y se procede a realizar diluciones para realizar la doble capa en agar. En el caso de aguas con ausencia de fagos o baja concentración y que tengan una baja turbidez, se realiza una concentración a partir de 1 L de agua (Mendez et al., 2004) y si presentan alta turbidez se realiza una floculación con hidróxido de magnesio (Schulze and Lenk, 1983, Sánchez-Alfonso, 2020).

Tabla 11.
Bacteriófagos utilizados para evaluar contaminación de origen fecal en aguas y las diferencias en la técnica de doble capa en agar según ISO.

Indicador	Cepa huésped	Fago de referencia	Medio de cultivo	Expresión de resultados
Colifagos somáticos	*Escherichia coli* WG5	øX174	Sholtens modificado	PFP Partículas Formadoras de Placas/ volumen
Fagos F RNA específicos	*Salmonella* typhimurium WG49	MS2	Agar Triptona, extracto de levadura glucosa	PFP. Partículas Formadoras de Placas/ volumen
Fagos que infectan cepas de *Bacteroides fragilis*	*Bacteroides fragilis* RYC2056	B56-3	BPRMB	PFP. Partículas Formadoras de Placas/ volumen

Figura 24.
SAgar Scholtens modificado (MSA) inoculado con la cepa E. coli WG5 y la muestra de agua residual evaluada tras 24 h de incubación a 37 °C. Se observan las placas de lisis por la acción del bacteriófago.



Cortesía de Claudia Campos.

9.2. Objetivos

Objetivo general

- Realizar análisis de colifagos somáticos en aguas superficiales por medio de la técnica de doble capa en agar.

Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de colifagos somáticos en aguas superficiales como indicadores de contaminación viral de origen fecal.

- Conocer las alternativas existentes para evaluar la contaminación por virus patógenos en agua y su interpretación.

9.3. Reactivos y medio de cultivo

- Agar Scholtens Modificado (MSA), (anexo A, numeral 37).

- Agar semisólido Scholtens Modificado (MSAss), (anexo A, numeral 38).

- Caldo Scholtens Modificado (MSB), (anexo A, numeral 39).

- Agua peptona 0,1 % (m/v) (anexo B, numeral 2).

- Bicarbonato de sodio.

- Cloruro de magnesio.

- Ácido nalidíxico. (anexo B, numeral 37)

- Cloruro de calcio. (anexo B, numeral 38).

- Tubos 16x100 mm tapa rosca con 9 mL de agua peptonada al 0,1 % (m/v), (anexo B, numeral 2).

- Muestra de agua superficial presuntamente contaminada con heces fecales, recolectada en frascos de polipropileno estériles.

- Frascos de vidrio Schott 100 mL.

- Pipetas automáticas de 1 mL.

- Pipetas automáticas de 5 mL.

- Puntas estériles para las dos pipetas automáticas.

- Cajas de agar Scholtens modificado (MSA).

- Tubos de 16x100 mm tapa rosca estériles y vacíos.

- Frascos Schott de 250 mL de capacidad con agar MSA semisólido (MSAss).

- Filtros de cápsula (poliéster sulfona PES) de 0,22 µm de poro X 33 mm de diámetro por grupo.

- Jeringa de 5 mL sin aguja.

- Gradillas plásticas.

- Frasco de muestreo de polipropileno de 500 mL.

- Recipientes plásticos con decol para desechos.

9.4. Equipos

- Baño termostatado.

- Vórtex.

9.5. Metodología

9.5.1. Inoculación de Escherichia coli WG5 para su crecimiento exponencial en medio MSB

Este procedimiento describe la inoculación de la cepa huésped antes de la prueba de colifagos somáticos, por tanto, se debe calcular el tiempo de incubación de esta para que a la hora de comenzar a realizar el análisis se tenga la bacteria en una concentración de 108 UFC/mL:

- Tomar un tubo tapa rosca de 13x100 mm para lectura en espectrofotómetro y adicionar la cantidad necesaria de caldo MSB (2-3 mL). Este servirá como blanco para realizar su lectura en el equipo a una longitud de onda a 600 nm.

- Tomar aparte un vial del cultivo de trabajo de *E. coli* WG5 almacenada en el congelador a -70°C y descongelar a temperatura ambiente (15 – 22°C).

•Tener 50 mL de caldo MSB en un frasco de vidrio tapa rosca con capacidad para 250 mL que debe estar a temperatura ambiente.

•**NOTA:** Para que el crecimiento ocurra más rápido caliente previamente el caldo a 37 °C.

•Utilizar el vortex para agitar el vial de bacteria descongelado y adicionar todo el contenido del vial de trabajo al caldo MSB mezclando bien.

•Retirar de 2-3 mL de esta mezcla aparte en un tubo tapa rosca 13x100 mm para posterior lectura en espectrofotómetro.

•Incubar a 36 +/- 2°C los 2 tubos (blanco y con bacteria inoculada), junto con el frasco de caldo MSB inoculado con bacteria, mientras se agita suavemente por espacio de 21⁄2h.

•Transcurrido el tiempo de incubación, ajustar el espectrofotómetro a cero.

•Usar el tubo con caldo MSB (blanco), ajustar el espectrofotómetro en cero nuevamente con una longitud de onda a 600 nm.

•Introducir en la celda del espectrofotómetro el tubo con la bacteria inoculada y medir la absorbancia que debe estar en un rango de densidad óptica entre 0,200 – 0,400 nm. (lo cual puede variar dependiendo de la curva de crecimiento de la cepa huésped).

•Registrar la absorbancia obtenida y comparar con el rango de Densidad Óptica (DO) deseada.

•Usar inmediatamente el cultivo. Si no se va a utilizar de inmediato refrigerar a -15°C por espacio máximo de 2 horas, con el fin de detener el crecimiento de la bacteria y mantener la concentración alcanzada.

9.5.2. Preparación del inóculo de E. coli WG5

•Inocular un vial de *E. coli* GW5 en 50 mL de caldo MSB.

•Incubar a 37± 2°C en agitación suave por 2 ½ horas.

•Medirabsorbanciaenelespectrofotómetro (λ:600 nm) hasta que la lectura este entre 0,200 -0,400, correspondiente a 108 UFC/ mL aprox. Utilizar MSB como blanco de la prueba.

•Mantener el inoculo a -15°C y usarlo antes de las próximas horas.

9.5.3. Preparación de la muestra

•A partir de la muestra original transferir 50 mL de la misma a un frasco schott de 50 mL de capacidad (agitar previamente).

•Tomar una alícuota de 5 mL con jeringa desdechable de 5 mL.

•Adaptar la jeringa sin la aguja al filtro PES de 0,22 µm y realizar la filtración completa de la alícuota de la muestra.

•Recuperar el filtrado en un tubo tapa rosca estéril de 16x100 mm.

•A partir del filtrado, realizar diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} en agua peptonada al 0,1% (m/v).

9.5.4. Determinación y cuantificación de colifagos somáticos en aguas residuales

•A partir de la muestra original transferir 50 mL de la misma a un frasco schott de 50 mL de capacidad (agitar previamente).

•A partir de las diluciones 10^{-1} a 10^{-3} de la muestra filtrada, adicionar 1 mL de cada solución a los tres tubos de 16x100mm tapa rosca, usando la misma pipeta, transfiriendo desde la más diluida hacia la más concentrada.

•A cada tubo con diluciones transferidas, adicionar 1 mL de la cepa de *E. coli* WG5 correspondiente a 10^{8} UFC/mL, determinada por DO.

•Adicionar a cada tubo 2,5 mL de MS Ass derretido completamente y a 45 +°C aproximadamente.

•Mezclar utilizando vortex y adicionar todo el contenido de cada tubo en cada caja con agar MSA.

• Homogenizar bien el contenido del tubo en las cajas antes de la mezcla se solidifique.

• Incubar a 37 +°C por 18 horas.

• Realizar el respectivo conteo del número de calvas formadas o zonas de aclaramiento.

• Calcular el número de PFP/ 100mL mediante la ecuación 27.

$$PFP\ de\ colifagos\ somáticos/100mL = \frac{NX100}{(VXF)}$$

(Ecuación 27)

Donde: N= Número total de placas contadas en la caja. V= Volumen usado en la prueba con dilución. F= Factor de dilución expresado en decimales. PFP= Partículas formadoras de placa.

9.6 Referencias

Anonymus. (2001). ISO 10705-4: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages- part 4: Enumeration of bacteriophages infecting Bacteroides fragilis. Geneva, Switzerland: International Standardization Organization.

Anonymus (1995). ISO 10705-1: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages- part 1: Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages. Geneva, Switzerland: International Standardization Organization.

Anonymus (2000). ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages- part 2: Enumeration of somatic coliphages. Geneva, Switzerland. International Standardization Organization.

Asano, T., Levine, D. (1998). Wastewater reclamation, recycling and reuse: an introduction. In Wastewater, Reclamation and Rreuse. Takashi Asano (Ed). (pp. 32). Lancaster, England. Technomic Publishing.

Bitton, G. (1995). Fate of bacteriophages in water and wastewater treatment plants. In Phage ecology. Goyal, S., Gerba, C., and Bitton, G. (Ed). (pp 181-195). Jhon Wiley & Sons. New York, USA.

Campos, C. (1999). Indicadores de contaminación fecal en la reutilización de aguas residuales para riego Agrícola. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona, España.

Grabow, W., Very, A., Uys, M. y Villiers, J. (1999). Evaluation of the application of bacteriophages as indicators or water quality. Report to the water research commission by the Department of Medical Virology. Faculty of Medicine. Grabow, W. (Ed). (pp 55). University of Pretoria. WRC Report N° 540/1/98. Pretoria South Africa.

IAWPRC. (1999). Bacteriophages as model viruses in water quality control. Water Research. 25(5), 529-545.

Jebri, S., Muniesa, M., Jofre, J. (2017). General and host-associated bacteriophages indicators of fecal pollution. In Global Water Pathogens. J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros (Ed). (pp 1-49). Michigan State University. UNESCO. Michigan, USA.

Mendez, J., Audicana, A., Isern, A., Llaneza, J., Moreno, B., Tarancón, B. Luisa, M. (2004). Standarised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water. Journal of Virological Methods. 117, 19-25.

Muniesa, M., Lucena, F., Jofre, J. (1999). Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic phages and their persistence in the environment. Journal of Applied Microbiology. 87, 402-409.

Schwartzbrod, L. (1995). Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture an aquaculture. Schwartzbrod, L (Ed). (pp 178). WHO Collaboration Centre for Microorganisms in wastewater. Université de Nancy. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

Schulze, E., Lenk, J. (1993). Concentration of coliphages from drinking water by Mg(OH)2 flocculation. Die Naturwissenchaften. 70, 612-3.

Wescott, D., Ayres, R. (1990). Criterios de calidad de aguas de riego. En riego con agua residual regenerada. Asano, T. (Ed). (pp 33-66). Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, España.



Capítulo 10

MONTAJE PARA LA EVALUACIÓN DE TOXICIDAD EN AGUAS CON *LACTUCA SATIVA* (MC INNIS, 1989)



Capítulo 10

MONTAJE PARA LA EVALUACIÓN DE TOXICIDAD EN AGUAS CON *LACTUCA SATIVA* (MC INNIS, 1989)

Campos-Pinilla C.

10.1. Introducción

Los vertidos de origen doméstico, industrial y agrícola son las fuentes más representativas de contaminación a nivel ambiental. En el caso de la contaminación de origen doméstico se evalúa la presencia de materia orgánica, nutrientes y microorganismos de origen fecal. Cuando la contaminación predominante es de origen químico, además de los parámetros físicoquímicos es importante evaluar el potencial tóxico del agua tanto para el medio ambiente como para la salud humana (Bayo et al., 2009, Movehedian, 2005).

La toma de decisiones para intervenciones inmediatas o para la formulación de políticas públicas con miras a la protección de la salud humana y del ambiente, así como la gestión ambiental (estrategias y directrices para proteger la integridad de los medios físicos y bióticos, así como los grupos sociales de los cuales dependen), requiere de una serie de medidas y muchas de ellas están relacionadas con la ecotoxicología.

La expresión de toxicidad de una sustancia química, depende de las características de exposición y de su comportamiento en el ambiente y en el sistema biológico. Además de las propiedades físicoquímicas de las sustancias, se debe considerar la magnitud, duración y frecuencia de exposición, las vías de introducción y la susceptibilidad de los organismos. Esta última está directamente ligada con los procesos toxicoxinéticos y toxicodinámicos. Se ha establecido que para que se produzca un efecto nocivo se deben presentar tres elementos:

- Un agente físico.

- Un sistema biológico con el cual el agente pueda interactuar para producir un efecto.

- Un medio que permita la interacción entre el agente y el organismo para producir efecto (Diaz et al., 2004).

La intoxicación se define como un conjunto de síntomas y signos que muestra un desequilibrio orgánico promovido por la acción de una sustancia tóxica y por lo tanto un estado patológico de un organismo frente a la presencia y concentración del agente tóxico. El organismo afectado puede ser el hombre o cualquier otro animal o vegetal (Azevedo y Da Matta, 2004; Zagatto y Bertoletti, 2006).

Los estudios de ecotoxicidad se realizan exponiendo a los organismos seleccionados del ambiente a varías concentraciones de una misma sustancia en un periodo determinado. En principio se debe considerar que no existe ningún organismo ni biocenosis que puedan ser usados para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema, bajo las diferentes condiciones bióticas y abióticas presentes. En la práctica, solamente unas pocas especies (especies modelo), que representan funciones ecológicas relevantes pueden ser ensayadas. Debido a la multiplicidad de especies existentes y de las relaciones de dependencia entre ellas, las pruebas son realizadas como mínimo con tres organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos, de modo que, al obtener un resultado con un organismo más susceptible, se evalúa con mayor seguridad la toxicidad presente en el agua (Diaz et al., 2004, Pandard et al., 2006).

Los criterios para seleccionar un organismo utilizado en este tipo de pruebas incluyen:

- Su representatividad en relación a un determinado grupo de importancia ecológica.

- La facilidad de mantenimiento en el laboratorio.

- Su estabilidad genética (poblaciones uniformes).

- Su pertinencia como miembro de una familia que pertenece a la cadena alimentaria del hombre.

Los parámetros de evaluación ecotoxicológica deben contemplar los diferentes niveles tróficos de manera que las pruebas de ecotoxicidad acuática deben ser realizadas con:

- Productores (algas).
  Ejemplo:*Pseudokirchneriella subcapitata* (antes *Scenedesmus capricornutum*).

- Consumidores primarios.
  Ejemplo: *Daphnia magna*.

- Consumidores secundarios.
  Ejemplo: *Danio rerio*.

- Descomponedores:
  Ejemplo.*Vibrio fischeri*.

Estos organismos son utilizados para evaluar toxicidad por medio de bioensayos, los cuales se realizan con diferentes organismos representantes de la cadena trófica, para prever efectos negativos en flora y fauna y en el hombre. Lo aconsejable en el caso de usar estos bioensayos es contar con una batería que incluya al menos un representante del grupo de los vegetales, animales y bacterias (Diaz et al., 2004; Forget et al., 2000; Zagatto y Bertoletti, 2006).

Un bioensayo se define como el método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente tóxico sobre un organismo vivo. Una prueba de toxicidad corresponderá al método utilizado para detectar y evaluar la capacidad de un agente para producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Su objetivo primario además de la obtención de datos para determinar los efectos sobre los sistemas biológicos, es caracterizar la relación dosis-respuesta del agente (Díaz et al., 2004, Zagatto y Bertoletti, 2006).

En general, los bioensayos tienen las siguientes características:

- Se realizan con grupos de organismos pertenecientes a la misma población, en buenas condiciones de salud y aclimatados previamente a las condiciones de ensayo.

- Los organismos se mantienen bajo condiciones ambientales constantes y normalizadas (calidad del agua, temperatura, oxígeno disuelto, iluminación, fotoperiodo, pH, salinidad).

- Se exponen a concentraciones graduales del tóxico.

- Se usan grupos control.

- Es necesario observar los signos de toxicidad durante y al final del ensayo.

- Se realiza medición y registro detallado de los efectos biológicos, tanto en los grupos tratados como en los de control.

- Se realiza observación del efecto en los grupos tratados y de control al final del ensayo.

- No son costosos, ni demasiados largos.

- Debe ser un método lo suficientemente reproducible para poder comparar la toxicidad de los diferentes productos a ensayar.

- Se realiza un apropiado análisis estadístico de los datos obtenidos.

Los resultados de un bioensayo se relacionan, en primer lugar, con los organismos usados en el ensayo bajo las condiciones estipuladas en el procedimiento de prueba. El efecto nocivo evaluado puede indicar niveles de peligrosidad trasladables y asimilables a organismos que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis (Diaz et al., 2004, Zagatto y Bertoletti, 2006).

Los efectos tóxicos de una muestra son evaluados por medio de variables biológicas como letalidad, inmovilidad, alteraciones del desarrollo, crecimiento, reproducción, metabolismo, fisiología y comportamiento de los organismos evaluados.

Los efectos medidos se pueden expresar con criterios cuantificables, como número de organismos muertos, número de crías producidas, reducción del crecimiento u otros parámetros metabólicos y cualitativamente, por cambios en el comportamiento de los organismos.

En relación a la expresión de resultados, para los ensayos de toxicidad aguda, se puede calcular la concentración media que causa un efecto adverso en el 50 % de los organismos evaluados durante un periodo de tiempo determinado (48, 72 o 96 horas). Para invertebrados generalmente se calcula la CE_{50}, entendida como la concentración media efectiva que inmoviliza 50 % de los organismos evaluados y para peces se calcula la CL_{50} que es la concentración letal media que afecta al 50 % de los organismos. Se utiliza un nivel de efecto del 50% ya que es la respuesta más reproducible y que puede ser estimada con mayor confianza. La CL_{50} y la CE_{50} se suelen expresar en términos de concentración de la sustancia evaluada en el tiempo de duración de la prueba y se pueden determinar por diferentes métodos estadísticos (Zagatto y Bertoletti, 2006).

El bioensayo con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas sobre el proceso de germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición de la germinación y elongación de la radícula y el hipocótilo (Bohorquez y Campos, 2007, Diaz et al., 2004).

Lactuca sativa es una planta comestible que pertenece a la familia de las compuestas, es decir *Asteraceae*. Son organismos que cuentan con ovarios internos, pétalos unidos (fusionados), corolas irregulares; en ocasiones cuentan con flores incompletas y a veces con flores imperfectas. Otra característica particular es que pertenecen a la clase dicotiledónea. Es importante destacar, que, durante la germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula, ocurren numerosos procesos fisiológicos, en los que la presencia de una sustancia tóxica, puede interferir alterando la supervivencia y desarrollo normal de la planta.

El efecto tóxico es expresado como porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula, respecto al promedio de elongación del control negativo de la

prueba. Posteriormente, se debe establecer la concentración a la cual se produce el 50% de inhibición (CI50) en el crecimiento de la raíz (Bohorquez y Campos, 2007, Pica-Granados et al., 2000).

Previo a la implementación de la prueba es recomendable verificar que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 90% y baja variabilidad de la elongación de la radícula (CV < 30 %).

Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados para el caso de semillas no seleccionadas y que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando únicamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio.

Es importante establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al control positivo (Zn^{+2}). La reducción del poder germinativo y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de la radícula en el control negativo a lo largo del tiempo, son indicadores de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas. En este caso, se recomienda utilizar un nuevo lote de semillas.

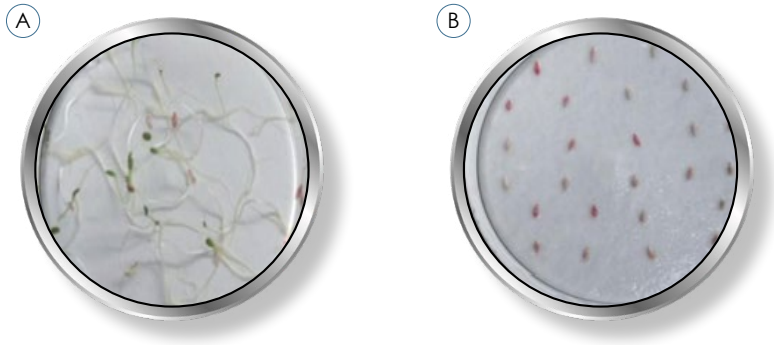
Para evitar variabilidad en los resultados, las semillas deben almacenarse máximo por 2 años en oscuridad y a 4°C, al cabo de este tiempo, es recomendable cambiar de lote.

Aunque existen y se mencionan muchas aplicaciones de los ensayos de toxicidad su uso como una herramienta de manejo del medio ambiente se ha centrado en la obtención de información para:

- Identificar y clasificar muestras potencialmente tóxicas.
- Definir el grado y extensión real de la contaminación tóxica.
- Identificar en residuos complejos las fracciones que aportan la toxicidad.

Por lo anterior es claro que la principal ventaja del uso de los bioensayos es obtener información sobre toxicidad, aunque no se pueda identificar la sustancia o sustancias que las causa. Los ensayos de toxicidad dan una visión integrada del efecto tóxico generado por diversos contaminantes presentes en una muestra, y los resultados expresan el peligro potencial para los organismos, lo cual es un resultado mucho más claro para un gestor ambiental (Cáceres et al., 2018, Diaz et al., 2004), (Figura 25).

Figura 25.
Resultados del ensayo de toxicidad aguda con Lactuca sativa.



Cortesía de Campos-Pinilla

10.2. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la toxicidad de un agua residual industrial sobre el desarrollo de Lactuca sativa.

Objetivos específicos

- Realizar el montaje de un bioensayo empleando semillas de Lactuca sativa.

- Interpretar los resultados del bioensayo con *Lactuca sativa* como índice de toxicidad en aguas.

10.3. Materiales, medios y reactivos

10.3.1. Preparación de las diferentes concentraciones del agua residual

- Balones aforados de 100 mL con tapa.

- Balón aforado de 100 mL con tóxico de referencia: Sulfato de Zinc ($ZnSO_4$).

- Frasco Schott de 250 mL con 150 mL de agua destilada.

- Frasco de muestreo de polipropileno de 500 mL. Para todo el grupo.

- Frasco Schott de 500 mL con 400 mL de agua a analizar por lado de mesa.

10.3.2. Montaje del bioensayo

- Cajas de Petri grandes.

- Papel Whatman No. 3 de 90 mm de diámetro: como soporte de germinación.

- Pinzas o palillos: para manipular semillas de L. sativa con pinzas en acero inoxidable o palillos.

- Probetas de 50 mL por grupo.

- Chupas plásticas.

- Papel aluminio.

- Toallas de papel.

- Regla.

- Semillas de Lactuca sativa.

10.4. Equipos

- Balanza.

- Incubadora a 19°C.

10.5. Metodología

- Medir con probeta 25 mL, 50 mL y 75 mL del agua residual.

- Depositar cada medida en balones aforados de 100 mL diferentes y completar hasta 100 mL con agua destilada.

- Homogenizar la solución invirtiendo los balones.

- Sobre un papel limpio y seco, seleccione semillas de tamaño, forma y color homogéneas para mantener uniformidad entre ellas.

- Separe solo la cantidad de semillas que se van a utilizar, ya que lo que se desea, es que estas se encuentren en perfecto estado para la realización del bioensayo.

- Marque correctamente cada caja de Petri con la dilución correspondiente, asi como la fecha de inicio y terminación de cada bioensayo.

- Coloque en cada caja de Petri sobre la tapa, un papel tipo watman No. 3.

- Sature el papel tipo whatman No. 3 con 4 mL de cada dilución, teniendo en cuenta que el papel debe quedar bien, húmedo. Procure que las semillas no queden flotando sobre el. Al adicionar la solución a cada filtro, evite la formación de bolsas de aire. Se debe adicionar el mismo volumen de la muestra concentrada en otra caja de Petri.

- Con una pinza coloque cuidadosamente 25 semillas (cinco hileras de 5 semillas) de manera simétrica, dejando el mismo espacio entre semillas para que cada una tome la misma cantidad de agua y permita el crecimiento radicular.

•Tape las cajas de Petri con la base de cada caja (teniendo precaución de no voltearlas) cúbralas con toallas de papel humedecidas, sin que destiles agua y luego envuélvalas en papel aluminio para evitar la pérdida de humedad.

•Incube a una temperatura de 22± 2°C por 120 horas (5 días), realice el mismo procedimiento con el control positivo (solución de Zinc) y el control negativo (agua destilada).

•Al cumplirse tiempo de incubación, con ayuda de la regla, mida cuidadosamente la longitud de cada raíz en milímetros, de cada una de las diluciones y de los controles.

Para determinar la CI_{50}, inicialmente se deben introducir los datos de las mediciones de cada semilla obtenidas en el bioensayo en la hoja de cálculo en Excel; con los resultados obtenidos en esta hoja, se calcula el porcentaje de crecimiento y el porcentaje de inhibición de la radícula, de la siguiente forma:

La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la raíz y el tallo) hacia el ápice radicular. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se debe calcular para cada dilución el porcentaje de crecimiento de la radícula y el porcentaje de inhibición, con respecto al control negativo. De los 25 valores obtenidos elimine 5 valores extremos y utilice solo el promedio de la lectura de 20 semillas para calcular el porcentaje de crecimiento empleando la ecuación 28.

$$\text{Crecimiento de radícula (\%)} = \frac{\text{Promedio crecimiento en la dilución}}{\text{Promedio crecimiento control negativo}} X100$$

(Ecuación 28)

Inhibición (%)=100-porcentaje de crecimiento

Una vez obtenidos estos valores, introdúzcalos en el programa estadístico Probit para obtener la CI_{50}. Tenga en cuenta que el control de calidad interno de su prueba, es el valor del tóxico control obtenido a partir de la carta control elaborada con el análisis de 20 muestras de diferentes concentraciones del Zn.

Si al introducir los valores encontrados en el Probit no obtiene resultados de la CI50, se puede informar con el valor encontrado en la concentración más baja donde aún se observa inhibición de la elongación de la semilla. Esto es posible siempre y cuando su carta control y el valor del tóxico control estén dentro de los rangos esperados.

10.6. Referencias

Azevedo, F., Da Matta, A. (2004). As bases toxicológicas da ecotoxicología. Sao Paulo, Brasil: RIMA editores e Intertox.

Bayo, J., Angosto, J. Gómes-López, M. (2009). Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wastewater by Vibrio fischeri bioassay after a chlorination-dechlorination process. Journal of Hazardous Materials. 172, 166-171.

Bohorquez, P., Campos, C. (2007). Evaluación de Lactuca sativa y Selenastrum capricornutum como indicadores de toxicidad en aguas. Universitas Scientarum. 12 (2), 83-98.

Díaz, MC. (2004). Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Cáceres-Campos, C., Oron, G. (2018). Toxicity effects of selected heavy metals on Lactuca sativa and Hydra viridissima used for sustainable crop production.

Forget, G., Gagnon, P., Dutka, B. (2000). Overview of methods and results of the eight-country international development research center (IDRC) Watertox Project. Environmental Toxicology. 15(4), 461-470.

McInnis, R. (1989). Short Term Elongation Toxicity Bioassay. National Water Research Institute (NWRI). Environment Canadá.

Mitchell, J., Burgess, J., Stuetz, R. (2002). Review's developments in ecotoxicity testing. Environmental Science and Biotechnology. 1, 169-198.

Movahedian, H., Bina, B., Asghary, G. (2005). Toxicity evaluation of wastewater treatment plant effluents using Daphnia magna. Journal Environmental Heath Science Engineering. 2 (82), 1-4.

Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A., Poulsen, V., Jourdain, M., Férar, J., Grand, C., Bispo, A. (2006). Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. Science of the Total Environment. 363, 114-125.

Pica-Granados, Y., Trujillo, GD., Hernández, HS., (2000). Bioassay standarization for water quality monitoring in Ciudad de México, México. Environmental Toxicology. 15(4), 322-330.

Zagatto, P., Bertoletti, E. (2006). Ecotoxicología Aquática. Principios e Aplicacoes. Sao Paulo, Brasil.



Capítulo 11

TRANSFORMACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS ORGÁNICOS SÓLIDOS



Capítulo 11

TRANSFORMACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS ORGÁNICOS SÓLIDOS

Rodrigo Ortega Blu, María Mercedes Martínez, Viviana Gutiérrez Romero, Lucía Ana Díaz, Natalia Sánchez Sánchez, Adriana Matiz Villamil, Aura Marina Pedroza Rodríguez

11.1. Introducción

11.1.1. Valorización de residuos orgánicos a través de un modelo de economía circular

La vida en la tierra depende del ciclo de carbono y otros nutrientes, como el nitrógeno, los cuales ocurren en el suelo, el agua y la atmósfera. Todos los seres vivos requieren de carbono, en diferentes formas, como fuente de energía y de alimento, mientras los ecosistemas dependen de la disponibilidad de recursos orgánicos e inorgánicos como materia prima para mantener los organismos vivos. Los materiales orgánicos se descomponen y se humifican para acumular materia orgánica en los suelos, por lo que los procesos de mineralización y humificación representan los procesos más importantes en el ciclo del carbono del suelo (Juul et al., 2013).

Durante la descomposición de los materiales orgánicos el carbono, nitrógeno, fósforo, y otros elementos se hacen disponible de las plantas, animales y microorganismos y se incorporan en el suelo importantes cantidades de materia orgánica. Además de la continua entrega de carbono y nutrientes, la materia orgánica representa enormes ventajas para las diferentes propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Yong et al., 2016).

En Latinoamérica, los residuos orgánicos representan entre el 60-70% de los residuos domiciliarios, y en algunos países el 100% de este material es vertido en rellenos sanitarios. La eliminación en vertederos o rellenos conduce a desviar el carbono y los nutrientes presentes en todos estos materiales, ubicándolos lejos de los ecosistemas donde fueron producidos y haciendo que su reutilización no sea posible.

Además, cuando se entierran los residuos orgánicos, se genera una descomposición anaeróbica incontrolada que lleva a la producción de gases de efecto invernadero como metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O). Es paradójico que en países donde día a día se pierden suelos por efecto de malas prácticas agrícolas y erosión, sea también donde menos se empleen los residuos orgánicos para generar abonos, haciendo circular el C que tanto se necesita para construir materia orgánica y mantener la producción agrícola empresas (Juul et al., 2013; Stephen and Periyasamy, 2018 Elsayed et al., 2020 Lim et al 2016; Yong et al., 2016), (Figura 27).

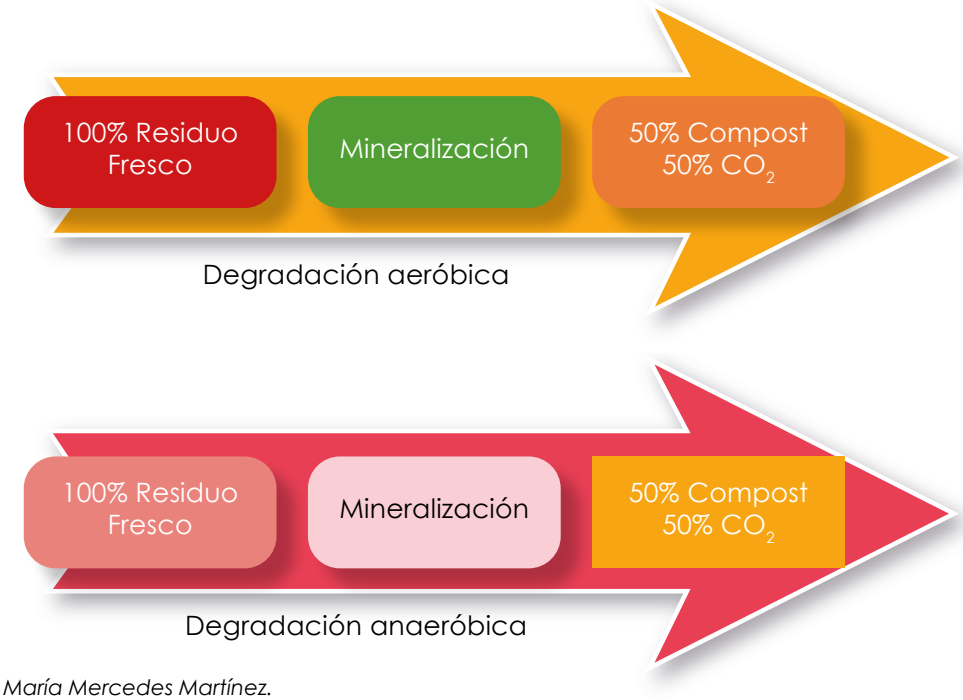
Para el aprovechamiento y transformación de materiales orgánicos, dentro de un modelo de economía circular se pueden emplear diferentes estrategias, con el fin de que los residuos de un proceso se aprovechan convirtiéndose en bio productos que serán materia prima o biomasa para procesos de producción de bioenergía (electricidad, calor, biodiesel, bioetanol o biogás) o materiales de base biológica "bio-based materials" como biopinturas, bioplásticos o biolubricantes. Adicionalmente, los subproductos transformados pueden ser empleados para la producción de alimentos, piensos o fertilizantes, valorizando los "residuos" con un efecto positivo sobre la huella de carbono, ayudan a disminuir las emisiones gaseosas y favoreciendo el uso sostenible de los recursos naturales (Xiang & Zheng 2017; Chandra et al., 2018, Martínez, 2017).

La transformación de los RSO se puede hacer por medio de procesos biológico, físicos y químicos (Figura 26). Dentro de los procesos biológicos se destacan las tecnologías como compostaje, vermicultura, digestión anaeróbica y obtención de sustratos de siembra (Lim et al 2016; Wainaina et al., 2020). En relación con los procesos físico y químicos, se destacan la conversión termoquímico o pirolisis, para la producción de diferentes clases de bio carbón o también denominado biochar (Moreno et al., 2019; Blanco et al., 2021).

11.1.2. Compostaje

El compostaje es el proceso biológico que se lleva a cabo en condiciones aeróbicas, en el cual la materia orgánica presente en los residuos vegetales o animales se descompone produciendo CO_2, agua, energía en forma de calor, nutrientes mineralizados y biomasa

Figura 26.
Comparación entre transformación aeróbica y anaeróbica.



Cortesía de María Mercedes Martínez.

microbiana. Luego de un tiempo, la temperatura cae, entrando en la etapa mesofílica y el proceso de estabiliza, es decir los organismos que producían enzimas ralentizan su actividad, dado que se empiezan a agotar nutrientes esenciales como N y P. hasta que aun en presencia de volteo y humedad la temperatura no se incrementa. Este punto corresponde al compost estable y posteriormente inicia la madurez (Martínez, 2017).

El material obtenido varia en calidad (compost tipo A y B según las normativas de cada país) y puede ser empleado en suelo con diferentes objetivos según sus contenidos de nutrientes o grado de madurez. Sin embargo, en relación a la toxicidad e inocuidad, en ningún caso (tipo de compost) deberá presentar compuestos tóxicos (metales pesados, hidrocarburos o derivados) en altas concentraciones, o patógenos que pongan en peligro la producción vegetal o la salud animal o humana (Martínez, 2017).

En el proceso aeróbico, se genera más biomasa que gas, estimándose del 100% del material original, una producción de 50% de CO_2 y 50% de compost en el balance final. El CO_2, la energía y el vapor de agua salen del sistema en especial durante la etapa termofílica, pero los nutrientes presentes en las proteínas, carbohidratos, lípidos, resinas etc., que originalmente componían la materia orgánica, son degradados por acción de enzimas microbianas y por efecto mecánico del volteo, y son mineralizados a sus componentes originales como $N\text{-}NH_4$, $N\text{-}NO_3$, SO_4, PO_4, etc (Martínez 2017).

La transformación de estos residuos es posible debido a que su componente orgánico se encuentra conformado por una fracción biodegradable, la cual está constituida por azúcares simples, aminoácidos, grasas, aceites, ceras, proteínas, minerales y por una fracción cuya degradación es más compleja constituida generalmente por celulosa, hemicelulosa, almidón y lignina, polímeros, entre otros, que pueden ser transformados mediante enzimas especificas las cuales son producidas por los microorganismos nativos presente en los residuos orgánicos (Viteri-Flórez et al., 2015). Aunque este proceso natural de descomposición es eficiente, su duración es variable, ya que está directamente relacionada con el origen y composición de los residuos. Los tiempos prolongados en el proceso de compostaje pueden generar problemas por el mayor tiempo de uso del espacio en las plantas de tratamiento de residuos sólidos (PTRS), que afecta directamente en la eficiencia y rentabilidad del proceso, así como, en la disminución de la capacidad de transformar mayores cantidades de material por lo cual, estos pueden acumularse en los lugares de acopio y generar problemas ambientales (Fourti, 2013).

Como solución a esta situación, es posible disminuir el tiempo de compostaje mediante el uso de inoculantes biológicos, también conocidos como bioinoculantes, que son productos que contienen uno o más microorganismos, vivos o latentes los cuales permiten acelerar el proceso de producción de compost debido a la capacidad enzimática de los mismos y adicionalmente, aumentan la humificación final del producto, lo que a su vez contribuye a que éste pueda producirse de mejor calidad fisicoquímica y microbiológica (Camacho et al., 2014; Queiroz et al., 2017). Estos bioinoculantes pueden estar conformados por bacterias, hongos o por consorcios microbianos que contengan organismos como *Aspergillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Penicillium* sp., *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp. entre otros (Xu et al., 2019; Stanley et al., 2017).

Uno de los sectores que ha adoptado esta tecnología de compostaje y uso de bioinoculantes como alternativa para el manejo de los residuos, es el sector porcícola, teniendo en cuenta que la mortalidad producida en la industria porcícola se dispone tradicionalmente en fosas, generando problemas ambientales por los lixiviados producidos en los procesos de descomposición no controlada o en el peor de los casos, estos residuos son incinerados, lo cual, puede contribuir a la formación de gases de efecto invernadero (GEI), (Medina-Lara et al., 2018; Matíz et al., 2020). Se consideró entonces el compostaje para el manejo de la mortalidad, por ser una estrategia segura y eficiente para disponer y aprovechar esta materia orgánica. Con el uso de los bioinoculantes permite de manera más eficiente, eliminar materiales de difícil

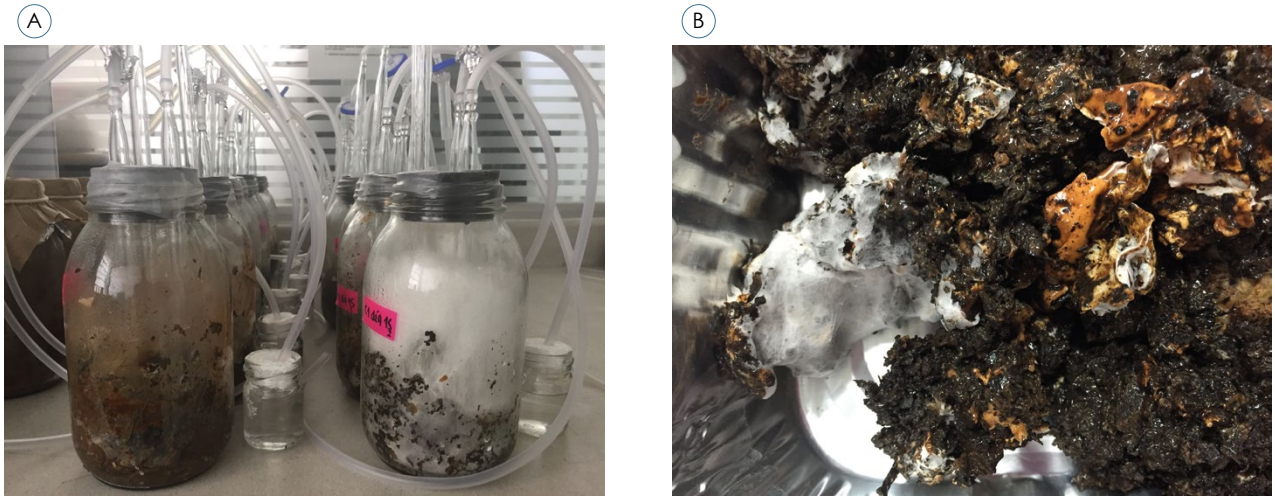
degradación como la queratina, elastina y colágeno presentes en pelo, huesos y piel de cerdos (Valenzuela-Sánchez, 2017; Won et al., 2016; Mohan et al., 2017; Ferraro et al., 2016).

El estudio de los procesos de biotransformación a través de procesos de compostaje se puede realizar a escala de laboratorio, piloto e industrial. A nivel de laboratorio existen varias configuraciones de biorreactores que permiten simular y controlar el proceso de transformación. Uno de los más utilizados son los sistemas de microcosmos que son un tipo de fermentadores sólidos estáticos que pueden una configuración de columna o bandeja. Los biorreactores en forma de columna son sistemas cerrados que permiten evaluar el flujo de CO_2 mediante respirometría y mantener el sistema libre de contaminantes; el suministro de aire no es costoso y permite controlar diversos factores del proceso. Los biorreactores tipo bandeja, se utilizan con mayor frecuencia en la producción de cuerpos fructíferos de hongos comestibles, posee las mismas ventajas del sistema de columnas y, adicionalmente, facilita la transferencia de calor, aumenta la superficie de contacto entre el oxígeno y la biomasa (Castillo et al., 2021). En la figura 27 se presenta el montaje a escala de laboratorio de varios sistemas de microcosmos para la co degradación de biomasa lignocelulósica y polietileno de baja densidad (Moreno et al., 2019; Castillo et al., 2021).

11.1.3. Biogas y biodigestatos

Alternativamente al tratamiento aeróbico de compostaje para tratamiento de residuos sólidos orgánicos, se cuenta con los sistemas anaeróbicos, en los que la materia orgánica presente en los residuos vegetales o animales se descompone produciendo en su mayoría gases (biogás), agua, nutrientes mineralizados y biomasa microbiana (biodigestato). El proceso produce mínimo calor por lo que no se reconoce una fase termófila como sí ocurre en el compostaje. El balance general de la biodigestión establece como mayor producto es el biogás, el cual se estima aproximadamente 70 %; este corresponde a una mezcla de gases compuesta en su mayoría por metano (CH_4), seguido por CO_2 y H_2S entre otros gases; igualmente se produce agua y un residuo solido o biodigestato (30%), de alta humedad y con contenido de nutrientes y sólidos que lo convierten en un potencial producto de uso agrícola o forestal (Martínez, 2017), (Figura 28).

Figura 27.
Sistemas de microcosmos a escala de laboratorio. (A) Biomasa lignocelulósica inicial y a los 60 días inoculadas con Pleurotus ostreatus. (B) Micelio de Pleurotus ostreatus colonizando la biomasa lignocelulósica.



Cortesía de Alejandra Moreno y Alejandra Castillo Toro.

Figura 28.

Sistemas de microcosmos a escala de laboratorio. (A) Biomasa lignocelulósica inicial y a los 60 días inoculadas con Pleurotus ostreatus. (B) Micelio de Pleurotus ostreatus colonizando la biomasa lignocelulósica.



11.1.4. Sustratos de siembra

Los sustratos de siembra son materiales distintos al suelo, minerales u orgánicos, que se emplean para el cultivo de plantas, abarcando desde su germinación hasta los siguientes estados fenológicos. Un sustrato de siembra debe escogerse considerando distintas características físicas, químicas y biológicas que garanticen su calidad y el crecimiento adecuado de las plantas. Es necesario que las partículas del sustrato le proporcionen estructura, porosidad, densidad aparente y capacidad de retención de agua apropiadas. En cuanto a las propiedades químicas, se deben considerar principalmente la conductividad eléctrica, la capacidad de intercambio catiónico, la disponibilidad de nutrientes y el pH que debe presentar valores entre 5,5 y 6,5. El sustrato también debe estar libre de patógenos que puedan afectar el desarrollo vegetal y la salud humana. Por otra parte, su madurez garantiza que no estén presentes compuestos fitotóxicos mientras que su estabilidad está relacionada con las tasas de descomposición y afecta la proporción C/N (Barrett et al., 2016; Raviv, 2005; Pascual et al., 2018). Otras consideraciones importantes al momento de elegir un sustrato de siembra son los costos y el impacto al medio ambiente.

La turba ha sido el sustrato más empleado para cultivo, sin embargo, en los últimos años se han buscado otros sustratos de siembra que sean de bajo costo y generen poco impacto ambiental. Existen distintos insumos orgánicos que pueden ser empleados para este fin (Schmilewski, 2008). Materiales lignocelulósicos como cortezas, virutas, aserrines y fibra de coco, presentan características físicas que les permiten constituir un insumo apropiado para la siembra de plantas luego de un proceso de transformación u oxidación. Otros materiales que se pueden transformar a través de procesos de compostaje y ser empleados como sustratos de siembra incluyen residuos orgánicos provenientes de la industria y los estiércoles animales.

> La evaluación de la calidad de los sustratos de siembra, además del análisis de sus características físicas, químicas y microbiológicas, debe incluir su efecto sobre diferentes etapas del crecimiento vegetal. Para llevar a cabo estos estudios, se puede comparar el crecimiento y desarrollo de distintas plantas en el sustrato de interés, retándolo con un sustrato utilizado convencionalmente para su cultivo.

•La turba es un sustrato que se obtiene a través de un proceso de descomposición anaeróbica. Es ampliamente usado ya que presenta propiedades físicas, químicas y biológicas deseables, aunque estas varían de acuerdo con su origen y las condiciones bajo las cuales fue producido. Por ejemplo, entre más descompuesto, su capacidad de retención de agua puede disminuir (Barrett et al., 2016).

•La fibra de coco es un residuo de la industria de la planta *Cocos nucifera*. Es un sustrato con un balance apropiado de aireación y agua. A pesar de esto, su alta conductividad eléctrica, baja capacidad de intercambio catiónico y alta proporción C/N pueden afectar su calidad (Stewart-Wade, 2020). Además, la fibra de coco algunas veces debe pasar por tratamientos que la estabilicen, lo que aumenta su costo (Barrett et al., 2016).

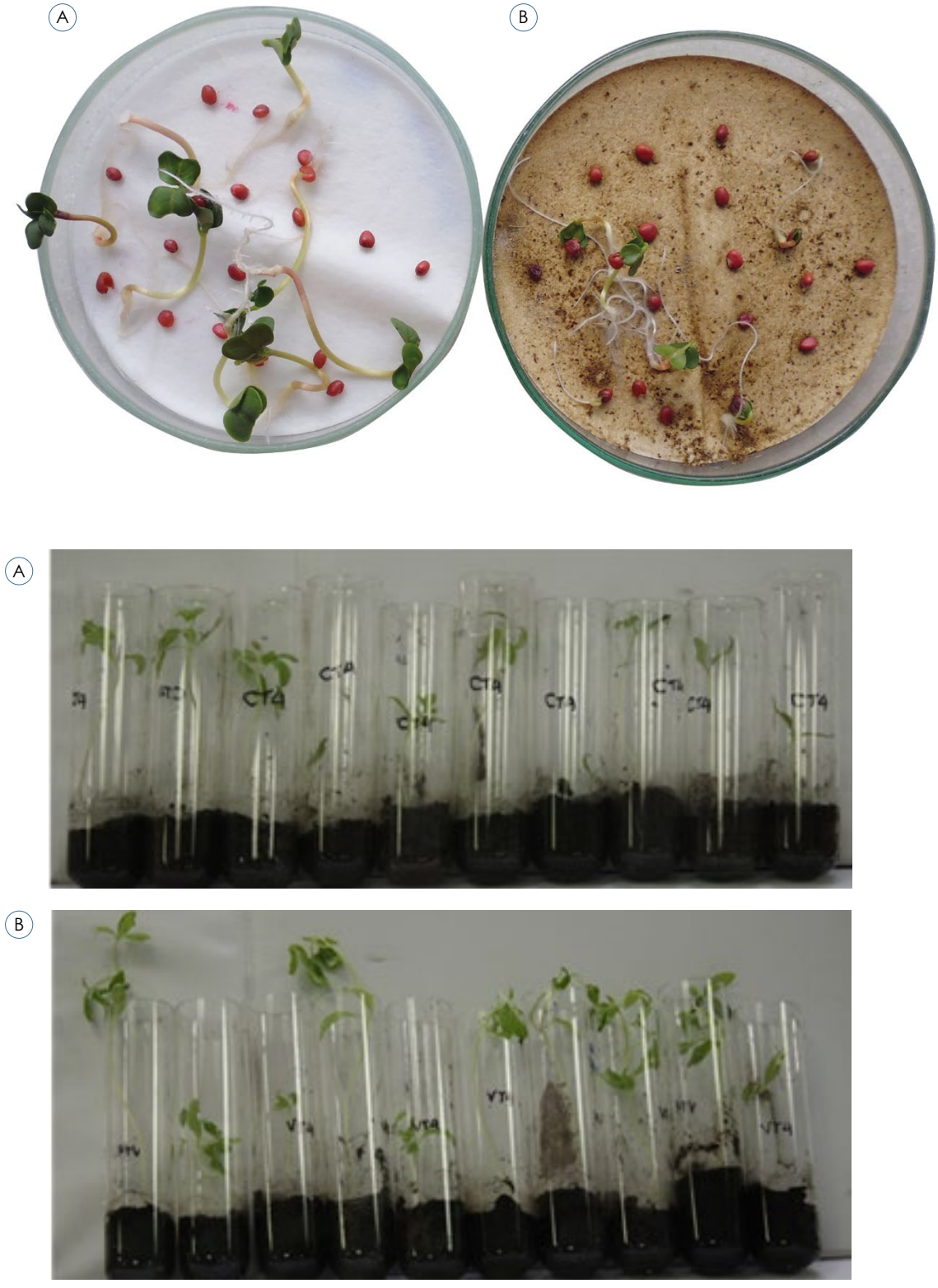
•La corteza, el aserrín y la viruta se obtiene de los residuos provenientes de la industria de la madera. Sus variables propiedades físicas, químicas y biológicas se han estudiado para evaluar su potencial uso como sustrato de siembra. La corteza es sometida a almacenamiento por largos periodos de tiempo o a compostaje para mejorar sus propiedades, que son distintas dependiendo del origen del material y el tamaño de las partículas, así como del tipo y duración del proceso de transformación (Pascual et al., 2018).

Para el cultivo de cada especie vegetal, es importante proporcionar los nutrientes y condiciones adecuados para su crecimiento. Por eso, luego de escoger un determinado sustrato de siembra, usualmente se aplican aditivos como fertilizantes y controladores de plagas de origen químico o biológico (Schmilewski, 2008). En las etapas de vivero, por ejemplo, dependiendo de la planta y sus requerimientos nutricionales, se formula fertilización con productos minerales como la roca fosfórica o con insumos orgánicos de origen vegetal o animal, tales como la harina de alfalfa, la harina de cáscara de cacao, residuos de café y compost de estiércol animal. Los productos basados en microorganismos promotores del crecimiento vegetal también pueden emplearse para enriquecer los sustratos generando beneficios relacionados con la disponibilidad de nutrientes para las plantas y el control de enfermedades (Pascual et al., 2018).

La evaluación de la calidad de los sustratos de siembra, además del análisis de sus características físicas, químicas y microbiológicas, debe incluir su efecto sobre diferentes etapas del crecimiento vegetal. Para llevar a cabo estos estudios, se puede comparar el crecimiento y desarrollo de distintas plantas en el sustrato de interés, retándolo con un sustrato utilizado convencionalmente para su cultivo. Usualmente, además de determinar variables relacionadas con la germinación de las semillas, se miden variables como la biomasa vegetal (Barrett et al., 2016). En la figura 29 se presenta algunos de los ensayos que se realizan para evaluar los sustratos de siembra antes de emplearlos en campo.

Figura 29.

Crecimiento de en diferentes sustratos de siembra: a y b. Semillas germinadas en papel de germinación y turba; c y d. Plantas de tomate sembradas en dos sustratos orgánicos 20 días después del trasplante.



Cortesía de Lucía Ana Díaz Ariza.

11.1.5. Conversión termoquímica o *pirolisis- biochar*

El proceso de pirólisis, es un tratamiento térmo-químico, que se le realiza a la biomasa o residuos sólidos orgánicos, para obtener un nuevo material o energía. Se basa en la conversión de los materiales mediante un proceso termoquímico en una atmósfera deficiente de oxígeno en los tres estados de la materia; sólido (char), líquido condensado (biocombustibles, biocrude y alquitrán) y no condensado (gas) (Blanco et al., 2021). El biochar es un producto sólido rico en carbono, extraído a partir de la descomposición de materia orgánica mediante un proceso termoquímico (Cha et al., 2016).

Varios autores han reportado que la aplicación de biochar a el suelo presenta enormes beneficios ambientales y ecológicos, la fijación de carbono, aporta a la capacidad de intercambio catiónico y nutrientes, así como a la aireación y estructura del suelo estimulando la actividad biológica de diferentes comunidades microbianas en suelo, sin embargo, también debe evaluarse el contenido de metales pesados que podría limitar su uso. Por otro lado, el biochar sirve como soporte para inmovilizar microorganismos benéficos con aplicación agrícola, como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, fijadores de nitrógeno, bacterias fosfato solubilizadoras y microorganismos bio controladores de diferentes tipos de fitopatógenos (Moreno et al., 2019; Blanco et al., 2021; Céspedes et al., 2021).

11.2. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar modelos a escala de laboratorio para transformar residuos orgánicos para la obtención de bio productos de mayor valor agregado.

Objetivos específicos

- Evaluar la transformación de residuos orgánicos sólidos empleando sistemas de fermentación en sólido aeróbicos a escala de microcosmos.
- Elaborar y caracterizar un biochar a partir de la conversión térmica a bajas de temperaturas de residuos sólidos orgánicos.
- Evaluar un método rápido para determinar la producción de metano en sistemas anaeróbicos.

11.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo

11.3.1. Sistemas de transformación de materiales orgánicos bajo fermentación sólida aeróbica en microcosmos

- Reactor para fermentación sólida de 0,75 L.
- Tapones de caucho con tres orificios.
- Puertos de entrada y salida de vidrio.
- Manguera siliconada.
- Frascos de vidrio de 10 mL.
- Residuos de cosecha, hojarasca, residuos de cocina, estiércol o materiales orgánicos disponibles.
- Agua destilada.
- Solución de glucosa y extracto de levadura al 0,1 % (m/v) (anexo B, numeral 6).
- Pinzas.
- Espátula.

11.3.2. Evaluación del crecimiento vegetal en sustratos de siembra

- Semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*).
- Sustratos: Fibra de coco, corteza o aserrín y turba.
- Tubos de ensayo de vidrio de 30 x 120 mm.
- Frascos de vidrio de 160 mL de capacidad.
- Calibrador.
- Bolsas de papel.

• Cajas Petri.

•Papel absorbente.

•Papel aluminio.

•Pipeta.

•Pinzas.

•Etanol (20% v/v), (anexo B, numeral 7).
•Agua destilada estéril.

•Hipoclorito de sodio (2,5% v/v),(anexo B, numeral 8).

11.3.3. Producción de biochar

•Bandejas de aluminio

•Biomasa lignocelulósica como residuos de poda, residuos de madera, residuos post-cosecha.

•Campanas de Anaerogen 3M® o sistemas artesanales para disminuir la concentración de O_2.

•Sobres de Anaerogen 3M®

•Pinzas.

•Espátula.

11.3.4. Caracterización física y química de residuos orgánicos y bio-productos

•Agua destilada.

•Cápsulas de porcelana.

•Tubos Falcon de 50 mL.

•Papel de filtro.

•Embudos.

•Frasco Schott o similar de 250 mL.

•Espátulas.

•Vidrios de reloj.

•Hidróxido de potasio 0,5 M (anexo B, numeral 5).

•Agua destilada.

•Kit para la detección de lignina soluble HACH.

11.4. Equipos

•Termo balanza.

•Balanza de tres dígitos.

•Horno eléctrico (0 a 400°C).

•pHmetro.

•Mufla de 0 a 800°C.

•Campana de anaerobiosis.

•Espectrofotómetro UV/VIS.

•Centrífuga que permita obtener hasta 8000 rpm.

•Incubadora.

11.5. Metodología

11.5.1. Sistemas de fermentación en sólido aeróbicos a escala de microcosmos in vitro

- •Colocar 50 g de biomasa lignocelulósica picada en bandejas de aluminio y esterilizar en autoclave por un ciclo a 120°C/15 psi durante 1 hora.

  •Colocar el sustrato en cada reactor y esterilizar por un ciclo a 120°C/15 psi durante 1 hora.

  •Inocular 5 mL de biomasa peletizada bajo condiciones de esterilidad producida como se menciona en el capítulo 4 del presente libro.

  •Mezclar con el baja lenguas el sustrato y la biomasa.

  •Tapar el reactor con el tapón de caucho que sirve como soporte para los puertos de entrada y salida (estas partes deben ser previamente esterilizadas por un ciclo a 120°C/15 psi durante 15 minutos).

•Conectar las mangueras de siliconada a cada uno de los 3 puertos del tapón y conectar el filtro de 0,22 micras.

•Conectar la trampa de NaOH al puerto de salida de CO_2.

•Realizar aireación conectando la manguera del puerto de aireación al motor de pecera.

11.5.2. Evaluación del crecimiento vegetal en sustratos de siembra

11.5.2.1. Preparación del material vegetal

•Lavar las semillas con agua durante 15 minutos.

•Adicionar etanol (70%) durante 30 segundos.

•Lavar tres veces con agua destilada estéril.

•Adicionar hipoclorito de sodio (2.5%) durante 5 minutos.

•Lavar tres veces con agua destilada estéril durante 5 minutos para un tiempo total de lavado de 15 minutos.

•Para el ensayo se utilizarán 15 plántulas, suponiendo un porcentaje de germinación del 60%, disponer 25 semillas en una caja Petri de manera equidistante sobre papel absorbente humedecido con agua destilada estéril o en la turba que utilizará como control (Figuras 30a y 30b).

•Envolver las cajas Petri con papel aluminio e incubar 5 días a 20-25°C.

11.5.2.2. Preparación de los sustratos de siembra

•Añadir el sustrato de siembra a los tubos de ensayo hasta llenar ¼ del tubo. Preparar cinco repeticiones por sustrato.

•Adicionar agua con la pipeta cuidadosamente hasta que el sustrato esté húmedo.

11.5.2.3. Siembra del material vegetal

•Cuando las semillas hayan germinado, disponer una en cada uno de los 15 tubos con ayuda de las pinzas y cubrir con papel aluminio.

•Llevar los tubos a incubación a temperatura de 20-25°C y fotoperiodo de 12 horas.

•Observar diariamente y eliminar el material que presente contaminación con hongos.

11.5.2.4. Medición del crecimiento vegetal

•Luego de 20 días, registrar la supervivencia y medir el crecimiento de las plantas diligenciando el formato al final de esta sección. Luego de medir la altura y la longitud radical con el calibrador, disponer las plantas en las bolsas de papel (1 planta/bolsa) y llevar a secado en horno durante 72 horas a 70°C. Finalmente, determinar el peso del material vegetal seco. Las plantas pueden alcanzar alturas superiores a la del tubo de ensayo (Figuras 29c). Destape el tubo y continúe con la incubación.

11.5.3. Producción de biochar

•Tamizar la biomasa a transformar usando tamices No 10, 12 y 20, para obtener un tamaño de partícula de 4-5±1 mm.

•Se secó 24 horas a 70°C y se preservó en bolsa plástica sello pack para controlar la humedad.

•Colocar 100 ± 5 g del material crudo en recipiente de aluminio de 250 g.

•Colocar el recipiente en una campana de anaerobiosis de 2,5 L (3M® u otra).

•Colocar dentro de la campana con un sobre de Anaerogen 3M®.

•Tapar la campana y realizar el desplazamiento del O2 por el catalizador del sobre por 12 horas a 19±2 °C.

•Transferir el recipiente a una mufla del 20L y cerrar la tapa de la mufla.

•Ajustar las condiciones de proceso a razón de 300±5 °C por 1 hora con una velocidad de calentamiento de 10°C min.

• Dejar enfriar la mufla y retirar el recipiente de aluminio.

• Colocarlo nuevamente dentro de la campana de anaerobiosis o dentro de un desecador para que no adquiera humedad.

• Realizar la caracterización física y química del material inicial y el biochar producido.

11.5.4. Determinación del porcentaje de humedad

• Pesar la cápsula de porcelana y registrar el peso.

• Adicionar a la cápsula de porcelana 5 g de biomasa inicial o biochar.

• Registrar el peso inicial húmedo.

• Secar la muestra en termobalanza hasta peso constante.

• Dejar enfriar la muestra, pesar nuevamente y registrar el porcentaje de humedad.

• Calcular el porcentaje de humedad empleando la siguiente ecuación 29.

$$Humedad(\%) = \frac{(Peso\ inicial - Peso\ final)}{Peso\ inicial}\ X100$$

(Ecuación 29)

11.5.5. Determinación de pH

• Pesar 10 g de biomasa lignocelulósica.

• Colocarlos en 40 mL de agua destilada.

• Agitar la mezcla en shaker por 20 minutos.

• Filtrar la muestra empleando papel filtro Whatman No 3 y embudo.

• Recuperar el filtrado en un vaso de precipitado de 100 mL. Si quedan sedimentos volver a filtrar.

• Determina el pH de la muestra.

11.5.6. Determinación de materia orgánica y carbono orgánico total (COT) para materiales sólidos

• Pesar 10 g de biomasa lignocelulósica y secar por 24 horas a 70°C. También se puede secar en termobalanza.

• Colocar 2 g del material seco en una cápsula de porcelana previamente pesada.

• Introducir la cápsula con el material a la mufla y ajustar la temperatura a 400°C.

• Realizar la ignición de material por 3 horas y dejar enfriar la mufla una vez cumplido el tiempo.

• Pesar nuevamente la capsula y registrar el peso pos ignición.

• Determine el porcentaje de materia orgánica y carbono orgánico total empleando la ecuación 30 y 31.

$$Materia\ org\acute{a}nica(\%) = (Peso\ inicial - Peso\ final)\ X100$$

(Ecuación 30)

$$COT(\%) = \frac{(Peso\ inicial - Peso\ final)\ X100}{1{,}724}$$

(Ecuación 31)

11.5.7. Determinación del grado de condensación E4/E6

• Pesar 4 g de material.

• Disponerlos en un tubo Falcon de 50 mL con 40 mL de KOH 0,5 M.

• Incubar a temperatura ambiente durante 24 h a 150 rpm.

• Centrifugar a 8000 rpm por 15 min y recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.

• Guardar en refrigeración a 4°C.

• En espectrofotómetro visible leer la longitud de onda a 465 nm y 665 nm, empleando como blanco agua destilada.

• Determine la relación de condensación E4/E6, dividiendo el valor de la absorbancia a 465 nm sobre el valor de absorbancia a 665 nm.

11.6. Referencias

Blanco, A., Chacon, M., Quintero, M., Poutou, R., Diaz, L., Devia, C., Castillo, L., Toledo, D., Pedroza, A. (2020). Co-inoculation of phosphate solubilizing bacteria in biochar their effects in Allium cepa L. Sometido 2020.

Camacho, A., Martínez, L., Ramírez, H., Valenzuela, R., Valdés, M. (2014). Potencial de algunos microorganismos en el compostaje de residuos sólidos. Terra Latinoamericana. 32(4), 291-300.

Cha, JS., Park, SH., Jung, SC., Ryu, C., Jeon, JK., Shin, MC., Park, YK. (2016). Production and utilization of biochar: A review. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 40, 1-15.

Chandra, R., Castillo, C., Delgado, P., Parra, R. (2018). A biorefinery approach for dairy wastewater treatment and product recovery towards establishing a biorefinery complexity index. Journal of Cleaner Production. 183, 1184-1196.

Alejandra Castillo-Toro, Juan F. Mateus-Maldonado, Diana N. Céspedes-Bernal, Leonardo Peña-Carranza, Adriana I. Páez-Morales, Raúl A. Poutou-Piñales, Juan C. Salcedo-Reyes, Lucía A. Díaz-Ariza, Laura C. Castillo-Carvajaf, Aura M. Pedroza-Rodríguez, Luis D. Gómez-Méndez. (2021). Evaluation of two microcosm systems for co-treatment of PEBDoxo-lignocellulosic biomass and Biochar production. 3 Biotech.

Elsayed, M., Ran, Y., Ai, P., Azab, M., Mansour, A., Jin, K., Abomohra, AEF. (2020). Innovative integrated approach of biofuel production from agricultural wastes by anaerobic digestion and black soldier fly larvae. Journal of Cleaner Production. 121495.

Fourti, O. (2013). The maturity test during the composting of municipal solid wastes. Resources, Conservation and Recycling. 72, 43-49.

García, MF. (2018). Efecto de condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad química, física y microbiológica de un sustrato orgánico para viveros. Trabajo de grado en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 1-76.

Ferraro, V., Anton, M., Santa, V. (2016). The "sisters" a-helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of application. Trends in Food Science & Technology. 51, 65-75.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y certificación ICONTEC. Norma técnica colombiana 5167. Productos para la industrial agrícola, productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y enmiednas o acondicionadores de suelos. Segunda edición. 2011. 1-51.

Juul, N., Münster, M., Ravn, H., Söderman, M.L. (2013). Challenges when performing economic optimization of waste treatment: A review. Waste management. 33(9), 1918-1925.

Lim, SL., Lee, LH., Wu, TY. (2016). Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: recent overview, greenhouse gases emissions and economic analysis. Journal of Cleaner Production. 111, 262-278.

Queiroz, N., Pereira, T., Martinez, L., De Castro. C., Souza, E. (2017). Microbial additives in the composting process. Cîencia e Agrotecnologia. 41(2), 159-168.

Martínez, M., Aprovechamiento de Residuos y Biomasa para producción de Bioenergía y fertilizantes orgánicos: economía circular de los residuos. Mundoagro 2017. Chile.

Medina-Lara, M., Quintero-Lizaola, R., Espinoza-Victoria, D., Alarcón, A., Etchevers-Barra, J., Trinidad-Santos, A., Conde-Martínez, F. (2018). Generación de un inoculante acelerador del compostaje. Revista Argentina de Microbiología. 50(2), 206-210.

Moreno, D., Gómez, L., Blanco, A., Castillo, A., Herrera, L., Poutou, R., Salcedo, J., Díaz, L., Castillo, L., Rojas, S., Pedroza, A. (2019). Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene

by Pleurotus ostreatus to biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. PLOS ONE.

Mohan, N., Ammayappan, L., Sarma, D., Debnath, S., Tamuli, M. (2017). Characterization of thermal properties of pig hair fiber. Journal of Natural Fibers. 14(4), 459-465.

Stanley, H., Onwukwe, C. (2017). Microbial and physicochemical properties of a regulated compost. Journal of Advances in Biology & Biotechnology. 16(1), 1-6.

Stephen, JL., Periyasamy, B. (2018). Innovative developments in biofuels production from organic waste materials: a review. Fuel. 214, 623-633.

Valenzuela-Sánchez, M. Manejo y disposición de la mortalidad en granjas porcícolas. Columna Porcicultura y Medio Ambiente. 2017.

Viteri-Flórez, P., Castillo-Guerra, D., Viteri-Rosero, S. (2015). Desarrollo y evaluación de un inóculo de bacterias celulolíticas. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 18(1), 207-215.

Wainaina, S., Awasthi, MK., Sarsaiya, S., Chen, H., Singh, E., Kumar, A., Kumar, S. (2020). Resource Recovery and Circular Economy from Organic Solid Waste using Aerobic and Anaerobic Digestion Technologies. Bioresource Technology. 122778.

Won, S., Park, J., Rahman, M., Park, K., Ra, C. (2016). Co-composting of swine mortalities with swine manure and sawdust. Journal Compost Science & Utilization. 24(1), 42-53.

Xiang, L., Yi, Z. (2017). Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. Biotechnology Advances. 35, 466–489.

Xu, J., Jiang, Z., Li, M., Li, Q. (2019). A compost-derived thermophilic microbial consortium enhance the humification process and alters the microbial diversity during composting. Journal of Environmental Management. 243, 240-249.

Yong, JY., Klemeš, JJ., Varbanov, PS., Huisingh, D. (2016). Cleaner energy for cleaner production: modelling, simulation, optimisation and waste management. Journal of Cleaner Production. 111, 1-16.

Capítulo 12

INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA E INDICADORES DE MADUREZ EN ENMIENDAS ORGÁNICAS



Capítulo 12

INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA E INDICADORES DE MADUREZ EN ENMIENDAS ORGÁNICAS

Ana Karina Carrascal, Irina Barrientos, Viviana Gutiérrez Romero,
María Mercedes Martínez

12.1. Introducción

Se entiende por inocuidad la garantía de que un alimento no causar enfermedad bajo las condiciones de uso previsto. En el campo son numerosos los factores que pueden aportar contaminación a los alimentos, y de especial cuidado cuando se trata de cultivos de consumo directo como es el caso de hortalizas y frutas. Agua de riego contaminada, abonos y enmiendas orgánicas crudas, mal procesados o sin tratamiento térmico, té de compost procedente de estiércoles frescos, son fuentes de contaminación microbiana por lo que para garantizar la inocuidad de los alimentos deben ser tratados antes de la aplicación (Martinez 2020).

Por ello, en especial los estiércoles animales o mezclas con estos materiales, deben ser tratados ya sea mediante compostaje o vermicompostaje u otros tratamientos que permitan eliminar el riesgo microbiológico. Los productores agrícolas, en especial los que se acogen a la norma FSMA deberán llevar los registros de producción deben incluir la fuente de todos los materiales utilizados en el compost. Si los materiales animales (como se utilizan harina de pescado y guano de murciélago), se deben mantener registros precisos de monitoreo de temperatura para demostrar que el compost alcanza las temperaturas óptimas según las pautas y manejar el proceso y el producto de manera que garantice no aporte de excesos de nutrientes, organismos patógenos, metales pesados o residuos de sustancias prohibidas que representen riesgo para la salud del consumidor (Martinez 2020).

El uso de estiércol crudo está restringido y el compost que contenga materiales animales debe producirse bajo ciertas condiciones y alcanzar la madurez para garantizar la inocuidad.

12.1.1. Indicadores de madurez

La calidad de las enmiendas es usualmente definida en función de su estabilidad y madurez. Sin embargo, el concepto de calidad es más amplio. La mayoría de los parámetros que determinan la calidad de los compost o vermicompuestos no son aplicables a todos los materiales y procesos de estabilización-maduración (compostaje y/o vermicompostaje). El concepto de madurez es utilizado haciendo referencia al grado de descomposición de las sustancias orgánicas fitotóxicas producidas durante la etapa de compostaje activa y se ha evaluado generalmente a través de bioensayos con plantas o semillas (Emino y Warman, 2004).

Compost, sustratos orgánicos y estiércoles tienen una alta proporción de su nitrógeno total en la forma de amonio (NH^{4+}) inmediatamente disponible para la planta. Esta proporción es superior en purines – (residuos líquidos: materia fecal, orín y agua, residuos de industria de cerdo, pollos, vacuno, otros) y digestatos provenientes de una digestión anaeróbica (producción de biogás) en comparación a tratamientos aeróbicos o parcialmente aeróbicos. Conocer las concentraciones de $N\text{-}NH_4$ es importante para determinar las dosis de aplicación y estimar con mayor exactitud las dosis de inhibidor de nitrificación (Martinez 2020).

12.1.2. Inocuidad microbiana en enmiendas orgánica

Las enmiendas orgánicas (EO) se definen como cualquier material adicionado al suelo para mejorar sus propiedades físicas o químicas (Reynells, 2016), dentro de estas enmiendas se incluyen estiércoles estabilizados, compost maduros y té de compost estables. Sin embargo, las EO se han reconocido como reservorio de bacterias patógenas como *Escherichia coli* productoras de toxina shiga (STEC) y Salmonella, siendo un riesgo en los cultivos de frutas y vegetales (Islam, 2005), que impactan en el sistema de salud pública, pues los datos recientes muestran que el número de brotes alimentarios asociados a frutas y vegetales van en incremento. Esta preocupación ha generado mayores controles en los diferentes países sobre la calidad y los criterios que deben cumplir las EO.

Los análisis microbiológicos constituyen un aspecto importante para determinar la calidad sanitaria de las enmiendas orgánicas. Para ello, se utilizan grupos indicadores, así como la detección de patógenos bacterianos y parasitarios (Román et al., 2013). A continuación, se describe la importancia de estos grupos.

Coliformes termotolerantes (denominados también fecales): Se denominan coliformes termotolerantes a un grupo de bacterias Gram negativas perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae* capaces de fermentar lactosa y producir indol a 44,5 °C, es un grupo de bacterias Gram negativas, esporuladas que se encuentran en el intestino (EPA, 2006). De acuerdo a la Agencia Ambiental de Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) la presencia de este grupo en un alto número es un posible indicador de la presencia de bacterias patógenas como Salmonella, Shigella y *E. coli* productoras de toxina shiga. También su presencia en concentraciones altas en una enmienda orgánica que se ha sometido a un proceso térmico indica que este falló (no se alcanzaron las temperaturas requeridas o el tiempo de exposición fue muy corto) (Wichuk & McCartney, 2007) o se presentó una contaminación posterior con agua contaminada durante las etapas de enfriamiento o presencia de utensilios contaminados. Se ha establecido que recuentos por debajo de 1,000 UFC/g (Unidades Formadoras de Colonia por gramo de peso seco), se asocia con la destrucción de los patógenos entéricos.

12.1.2.1. Bacterias patógenas

En materias primas como los estiércoles pueden encontrarse bacterias patógenas para humanos y animales, siendo de especial interés la presencia de Salmonella spp. Este microorganismo es uno de los principales agentes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y puede ser habitante normal del tracto digestivo de animales que incluyen aves (siendo el pollo un importante reservorio), bovinos, porcinos entre otros

(INS, 2011). Igualmente es de interés *E. coli* productoras de toxina shiga (STEC), que se ha asociado a enfermedades causadas por consumo de frutas y vegetales crudos o sus productos no pasteurizados (Islam, 2005). Estas bacterias tienen como reservorios diversos animales incluidos bovinos, ovinos y ciervos, y pueden sobrevivir hasta 70 días en el estiércol, dependiendo de la concentración y la temperatura. Con relación a este microorganismo existe evidencia de un brote alimentario asociado al consumo de lechuga donde se estableció que la fuente de contaminación fue con escorrentía de estiércol proveniente de una granja ganadera adyacente (calFERT (California Food Emergency Response Team), 2008). Adicionalmente, se ha logrado establecer que el viento puede ser una fuente de diseminación de patógenos provenientes de estiércoles que se producen en granjas pecuarias y se encuentran cercanas a granjas productoras de frutas y vegetales, por tanto, existen recomendaciones que señalan que la distancia mínima entre explotaciones ganaderas y cultivos de frutas y vegetales debe ser al menos de 120 metros (LGMA, 2013).

Otros patógenos que se han encontrado en compost y que podrían llegar al hombre por el consumo de alimentos contaminados incluyen: *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Cryptosporidium parvum* (Beuchat, 2006). Recientemente una de las grandes preocupaciones en salud pública es la presencia de bacterias con genes de resistencia a antibióticos que se han reportado en estiércoles, se ha demostrado la presencia de coliformes con marcadores de resistencia a macrólidos en cultivos de vegetales que fueron abonados con estiércoles que contenían estos antibióticos (Marti, 2013). Por tanto, el uso de estiércol puede alterar la población general del microbioma del suelo al aumentar la proporción de bacterias resistentes a los antibióticos en los cultivos (Reynells, 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior los microorganismos que se buscan en EO para evaluar la inocuidad de estos insumos es la detección de Salmonella y coliformes termotolerantes, existen diferentes métodos referenciados para la detección de estos microorganismos, siendo ampliamente reconocidos los métodos establecidos por la EPA.

Tabla 12.

Normas sobre los requisitos que deben cumplir las enmiendas orgánicas para cultivos.

Microorganismo	Límite de tolerancia				
	Chile NCh 2880/04		Unión Europea	Colombia NTC 5164/2004	México NTEA-006-SMA-RS-2006
	A		B		
Coliformes fecales (termotolerantes)	<1000 NMP/g	<2000 NMP/g	<1000 UFC/g	<1000 UFC/g	<1000 UFC/g
Salmonella spp	Ausente en 25g del producto	Ausente en 25g del producto	Ausente en 25 g del producto	Ausente en 25 g del producto	<3 NMP/g base seca
Enterococcus faecalis	ND	ND	1000 NMP/g	ND	ND
Huevos viales de helminto/Ascaris	Ausente en 1g	Ausente en 1g	Ausente en 1g	ND	Menor a 10
Hongos fitopatógenos	ND	ND	Algunos países incluyen Plamodiosphora	Ausente según especie vegetal	Ausente

Tomado de: Román et al., 2013 (FAO, 2013)

12.2. Objetivo

Objetivo general

- Evaluar la calidad química y microbiológica para enmiendas orgánicas.

Objetivos específicos

- Establecer la calidad microbiológica de enmiendas orgánicas.
- Determinar la calidad química de enmiendas orgánicas.

12.3. Materiales, reactivos y medios de cultivo

12.3.1. Método 1682 para Salmonella (U.S. EPA, 2006)

- Balanza digital con sensibilidad de 0,1 g.
- Cubiertos estériles.
- Pipeta automática de 0.1-1 mL.
- Pipeta automática de 5-10 mL.
- Puntas estériles (20-200 µL).
- Puntas estériles (5-10 mL).
- Asa desechable de 1 µL.
- Tubos de vidrio 16 x 150 Tapa rosca.
- Cajas de Petri 15 mm x 90 mm.
- Agua bufferada peptonada (anexo B, numeral 2).
- Caldo Tripticasa de Soya (TBS), (anexo A, numeral 40).
- Medio Rapapport semisólido (anexo A, numeral 41).
- Agar xilosa, lisina y desoxiolato X.L.D. (anexo A, numeral 42).
- Agar tripe azucar hierro TSI (anexo A. numeral 43).
- Agar lisina hierro LIA (anexo A, numeral 44).
- Agar infusión cerebro corazón BHI (anexo A, numeral, 45).
- Caldo Urea.
- Antisuero polivantente "0".

12.3.2. Método 1680. Número más probable usando caldo lauril sulfato y medio EC para coliformes fecales. (U.S. EPA, 2004)

- Caldo Lauril Sulfato (anexo A, numeral, 46).
- Caldo EC (anexo A, numeral, 47).
- Tubos de 16x150 mm para rosca.
- Frasco Schott de 250 mL.
- Pipeta automática de 100-100 µL.

12.3.3. Ensayos de fitotoxicidad de los biomateriales obtenidos con uso en fertilización

- Semillas de rábano (*Raphanus sativus*), lechuga (*Lactuca sativa*), pepino cohombro (*Cucumis sativus*).
- Cajas de Petri o recipientes plásticos o de vidrio.
- Papel filtro o toallas absorbentes.
- Compost fresco, compost maduro, biochar, estiércol, o materiales orgánicos transformados y a emplear en fertilización.
- Agua preferiblemente destilada o aireada.
- Incubadora a 25°C.
- Bolsas plásticas negras o lugar oscuro.

12.3.4. Actividades enzimáticas en enmiendas orgánicas

12.3.4.1. Actividad fosfatasa

- Material orgánico o enmienda orgánica.
- Un frasco Schott de 25 mL con 4-p-nitrofenil fosfato (0,1 M) preparado en una solución buffer universal MUB a pH 7,0 (anexo B, numeral 17).

•Un frasco Schott de 25 mL con NaOH (0,5M) (anexo B, numeral 18).

•Un frasco Schott de 25 mL con $CaCl_2$ (0,5M) (anexo B, numeral 19).

•Un frasco Schott de 25 mL *p-nitrofenol* (0,01-0,06 µmol/L) (anexo B, numeral 20).

•Erlenmeyer de 250 mL.

•Papel filtro Whatman No 42.

•Embudo.

•Pipeta automática de 100-1000 µL.

•Puntas azules.

12.3.4.2. Actividad amonio monoxigensa

•Material orgánico o enmienda orgánica.

•Un frasco Schott con buffer MUB pH 6,0 (anexo B, numeral 17).

•Frasco Schott de 25 mL con buffer Tris-HCL buffer (0,05 M, pH 8,0) (Anexo B, numeral 40).

•Erlenmeyer de 250 mL.

•Un frasco Schott de 25 mL con sulfato de amonio 200 mM (anexo B, numeral 41).

•Papel filtro Whatman No 42.

•Frascho Schott de 25 mL con reactivo de Griess-Illosvay (anexo B, numeral 15).

•Pipeta automática de 100-1000 µL.

•Puntas azules.

12.4. Equipos

•Balanza.

•Incubadora.

•Horno a 100°C.

•Baño de agua termostadado.

• Vortex.

•Espectrofotómetro.

•Shaker.

12.5. Metodología

12.5.1. NMP para Salmonella de acuerdo al método 1682 (EPA, 2006)

•Bajo condiciones de esterilidad a partir de la muestra, se pesan 30 g con cubiertos.

•Se agregan a 270 mL de agua peptonada bufferada y se agita para homogenizar la muestra.

Para realizar las diluciones:

•A partir de la muestra homogenizada agregar 20 mL en cada uno de los tubos de la serie (5 tubos) que contienen 10 mL de Caldo TSB 3x (triple concentración).

•A partir de la de la muestra homogenizada agregar 10 mL en cada uno de los tubos de la serie (5 tubos) que contienen 5 mL de Caldo TSB 3x (triple concentración).

•A partir de la muestra homogenizada agregar 1 mL en cada uno de los tubos de la serie (5 tubos) que contienen 10 mL de Caldo TSB 1x.

•Mezclar los tubos con movimientos de inversión.

•Incubar los tubos por 24 ± 2 horas a 36°C ± 1,5°C.

•Después del tiempo de incubación, se colocan 30 µL 5 veces de cada uno de los tubos de caldo TSB en una caja de Petri con medio Rappaport Vassiliadis Semisólido (MSRV). No invertir las cajas. Dejar que las gotas se absorban en el medio durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente y llevar a incubar a 42°C ± 0,5°C durante 16 a 18 horas.

•Después del tiempo de incubación, se revisan las cajas para observar la motilidad que rodea las gotas; para una motilidad positiva se debe observar un "halo blanquecino" de crecimiento aproximadamente de 2 cm desde el centro de la mancha.

•Usando un asa, tomar muestra en un halo desde el borde exterior de una colonia del medio MSRV y aislar en una caja de Petri con medio selectivo para *Salmonella* (XLD).

•Incubar las cajas del agar selectivo durante 24 horas a 36°C ± 1,5°C.

•Seleccionar las colonias que presentan morfología característica de Salmonella e inocular en los tubos de las bioquímicas TSI (agar hierro triple azúcar), LIA (agar lisina hierro) y caldo Urea. Utilizar la misma colonia para inocular los tres medios. Inocular cada medio con los controles positivo y negativo.

•Incubar durante 24 ± 2 horas a 36°C ± 1,5°C.

•Para confirmación mediante antisuero polivalente O:

Emulsionar el crecimiento en la porción inclinada de TSI (independientemente de si TSI es positivo o negativo) usando solución salina estéril. Colocar dos gotas del crecimiento emulsionado en el portaobjetos. A la primera gota, agregar una gota de antisuero polivalente O. A la segunda gota, agregar una gota de solución salina estéril (como comparación visual). Observe bajo aumento para una reacción de aglutinación que indica un resultado positivo. Se deben analizar los controles positivos y negativos apropiados de TSI para cada una de las muestras.

12.5.1.2. Determinación de sólidos totales

Determinación del porcentaje de peso en seco: Inmediatamente después de pesar la muestra para el examen microbiológico, se pesan 4 g de muestra en un crisol o plato de evaporación de aluminio. Seque esta alícuota durante la noche a 103°C a 105°C. Deje que se enfríe en un desecador antes de pesar. Calcule el porcentaje de peso seco empleando la ecuación 32.

$$\%\ Peso\ seco = \frac{g\ de\ la\ muestra\ seca}{g\ de\ la\ muestra\ inical}\ X100$$

(Ecuación 32)

12.5.1.3. Análisis de datos y cálculos

La densidad estimada de Salmonella se calcula como el número más probable (NMP) en base a peso seco. Los resultados de Salmonella de muestras de biosólidos se informan como NMP/4 g de sólidos totales (base de peso seco), que se calcula de acuerdo con los siguientes pasos:

•Selección de NMP/g (peso húmedo)

Obtenga el valor del índice NMP en la tabla del anexo C usando la cantidad de tubos positivos en las tres series de diluciones significativas. Como las muestras sólidas se diluyeron en la etapa de homogeneización, la dilución debe tenerse en cuenta al calcular el NMP/ mL (peso húmedo). Como resultado, el valor del índice NMP de la Tabla 5 se divide por 0,1 para tener en cuenta la dilución de la muestra durante la etapa de homogeneización. Para estos datos use la tabla de NMP que se encuentra en el siguiente enlace https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-1682.pdf.

•Conversión a NMP/ g (peso seco) y cálculo de MPN/4 g de sólidos totales (peso seco)

Para la conversión a NMP/g de sólidos totales (peso seco), suponemos que, NMP/mL de peso húmedo = NMP/g de peso húmedo. Por lo tanto, podemos calcular NMP/4 g de sólidos totales (peso seco) para muestras líquidas utilizando la siguiente ecuación 33. En la tabla 13 se presenta un ejemplo para realizar el cálculo de NMP/g de *Salmonella* sp.

$$\frac{NMP}{4g\ (peso\ seco)} = \frac{\frac{NMP}{(mL\ peso\ húmedo)x4}}{Porcentaje\ solidos\ totales\ (decimales)}$$

(Ecuación 33)

Tabla 13.
Ejemplo para el cálculo para NMP/g de Salmonella sp

Ejemplo	Volumen de la muestra homogenizada utilizado para inocular tubos con TSB			NMP/mL (peso húmedo)	Porcentaje de sólidos totales (peso seco)	NMP/4g (peso seco)
	20 mL	10 mL	1 mL			
D (solido)	0/5	1/5	0/5	0,0067/0,1=0,067	96%	(0,067) x (4)/(0,96)=0.28 MPN/4g
E (solido)	4/5	4/5	4/5	0,1181/0,1=1,181	18%	(1,181) x (4)/(0,18)=26 MPN/4g
F (solido)	5/5	2/5	2/5	0,5422/0,1=5,422	43%	(5,422) x (4)/(0,43)=50 MPN/4g

12.5.2. Método 1680. Número más probable usando caldo lauril sulfato y medio EC para coliformes fecales. (U.S. EPA, 2004)

•Diluciones: Pese 11 gramos de las muestras y páselos a un recipiente con 99 mL de agua buferada peptonada (dilución 10^{-1}). A partir de esta dilución tome 11 mL y páselos a 99 mL de agua buferada peptonada (dilución 10^{-2}). Continúe realizando diluciones hasta 10^{-5}.

•Inoculación: Marque 5 tubos de caldo LB con campana de Durham con la dilución 10-1, en cada tubo transferir con una pipeta estéril un mL de la dilución 10^{-1}.

•Marque 5 tubos de caldo LB con campana de Durham con la dilución 10^{-2}, en cada tubo transferir con una pipeta estéril un mL de la dilución 10^{-2}.

•Marque 5 tubos de caldo LB con campana con la dilución 10^{-3} en cada tubo transferir con una pipeta estéril un mL de la dilución 10^{-3}.

•Marque 5 tubos de caldo LB con campana de Durham con la dilución 10^{-4}, en cada tubo transferir con una pipeta estéril un mL de la dilución 10^{-4}.

•Marque 5 tubos de caldo LB con campana de Durham con la dilución 10^{-5}, en cada tubo transferir con una pipeta estéril un mL de la dilución 10^{-5}.

•Mezcle los tubos con las diluciones y lleve a incubar a 35°C +/-0,5°C durante 24 horas. Terminado este tiempo, revise cada tubo en busca de crecimiento y producción de gas. Si presenta crecimiento, pero no hay formación de gas, reincube durante 24 horas más.

•Confirmación: Cada uno de los tubos que dieron positivos se pasa con asa redonda a caldo EC. Incubar en baño de agua a 44,5°C durante 24 h. Después de la incubación revise los tubos que produzcan gas y presente crecimiento. Los tubos que cumplan con estas dos reacciones son considerados coliformes fecales.

•Calcule el NMP en peso seco revisando la tabla de NMP.

•Selección de NMP/g (peso húmedo) Obtenga el valor del índice NMP en la tabla de NMP. (Use la tabla del siguiente enlace https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-1682.pdf) usando la cantidad de tubos positivos en las tres series de diluciones significativas. Como las muestras sólidas se diluyeron en la etapa de homogeneización, la dilución debe tenerse en cuenta al calcular el NMP/mL (peso húmedo). Como resultado, el valor del índice NMP del anexo C se divide por 0,1 para tener en cuenta la dilución de la muestra durante la etapa de homogeneización.

•Conversión a NMP/g (peso seco) y cálculo de MPN/4 g de sólidos totales (peso seco).

•Para la conversión a NMP/g de sólidos totales (peso seco), suponemos que, NMP/mL de peso húmedo = NMP/g de peso húmedo. Por lo tanto, podemos calcular NMP/4 g de sólidos totales (peso seco) para muestras líquidas utilizando la ecuación 34:

$$\frac{NMP}{4g\ (peso\ seco)} = \frac{\frac{NMP}{(ml\ peso\ húmedo)x4}}{Porcentaje\ solidos\ totales\ (decimales)}$$

(Ecuación 34)

> Realizar el conteo del número de semillas germinadas en cada caja incluyendo el testigo y estimar el % de germinación, teniendo en cuenta que la germinación del blanco, será nuestra referencia (100 %) en la prueba del producto.

Tabla 14.
Ejemplo para el cálculo para NMP/g de E. coli

Ejemplo	Volumen de la muestra homogenizada utilizado para inocular tubos con TSB			NMP/ml (peso húmedo)	Porcentaje de sólidos totales (peso seco)	NMP/4g (peso seco)
	20 mL	10 mL	1 mL			
D (solido)	0/5	1/5	0/5	0,0067/0,1=0,067	96%	(0,067) x (4)/(0,96)=0.28 MPN/4g
E (solido)	4/5	4/5	4/5	0,1181/0,1=1,181	18%	(1,181) x (4)/(0,18)=26 MPN/4g
F (solido)	5/5	2/5	2/5	0,5422/0,1=5,422	43%	(5,422) x (4)/(0,43)=50 MPN/4g

12.5.3. Fitotoxicidad (Basado en el método propuesto por Zucconi, 1981)

•Emplear semillas de Rábano rojo o lechuga por ser altamente sensibles a la presencia de sales u otros elementos tóxicos en el material orgánico o sustrato.

•Realizar una mezcla 1:1 del material a analizar con agua destilada.

•Preparar el blanco con solo agua destilada.

•Recortar el papel absorbente al tamaño del recipiente en el que se hará la prueba (cajas plásticas o cajas de Petri) y colocarlo en el fondo del recipiente.

•Colocar 20 semillas/ caja de cualquiera de las especies vegetales mencionadas en tantas cajas como materiales orgánicos considere para evaluar.

•Caja 1, corresponderá al tratamiento 1 (material orgánico 1) y caja 2 al material orgánico 2, etc. Incluir una caja como testigo.

•Prepara las diluciones de los materiales 1:20 en agua (1 g de material en 20 mL de agua preferiblemente destilada y desionizada).

- Humedecer con 9 mL de la solución (agua + material) teniendo en cuenta que la caja marcada como testigo solo llevará 1 mL de agua (la misma empleada para hacer la dilución). El método original sugiere 10 repeticiones/ material.

•Incubar a 25 +/-2°C en oscuridad (cubrir las cajas con papel aluminio o llevarlas a incubadora) / 48 horas.

•Realizar el conteo del número de semillas germinadas en cada caja incluyendo el testigo y estimar el % de germinación, teniendo en cuenta que la germinación del blanco, será nuestra referencia (100 %) en la prueba del producto. Emplear la ecuación 35 para determinar el porcentaje de germinación.

$$\%\ germinación = \frac{Compost}{Control} X100$$

(Ecuación 35)

Dónde: Compost: Número de semillas germinadas en la caja con el extracto de compost

Control: Número de semillas germinadas en el control

•Cuantificar el largo de la raíz luego de 5 días de incubación y expresar los resultados como Índice de germinación (IG) empleando la ecuación 36:

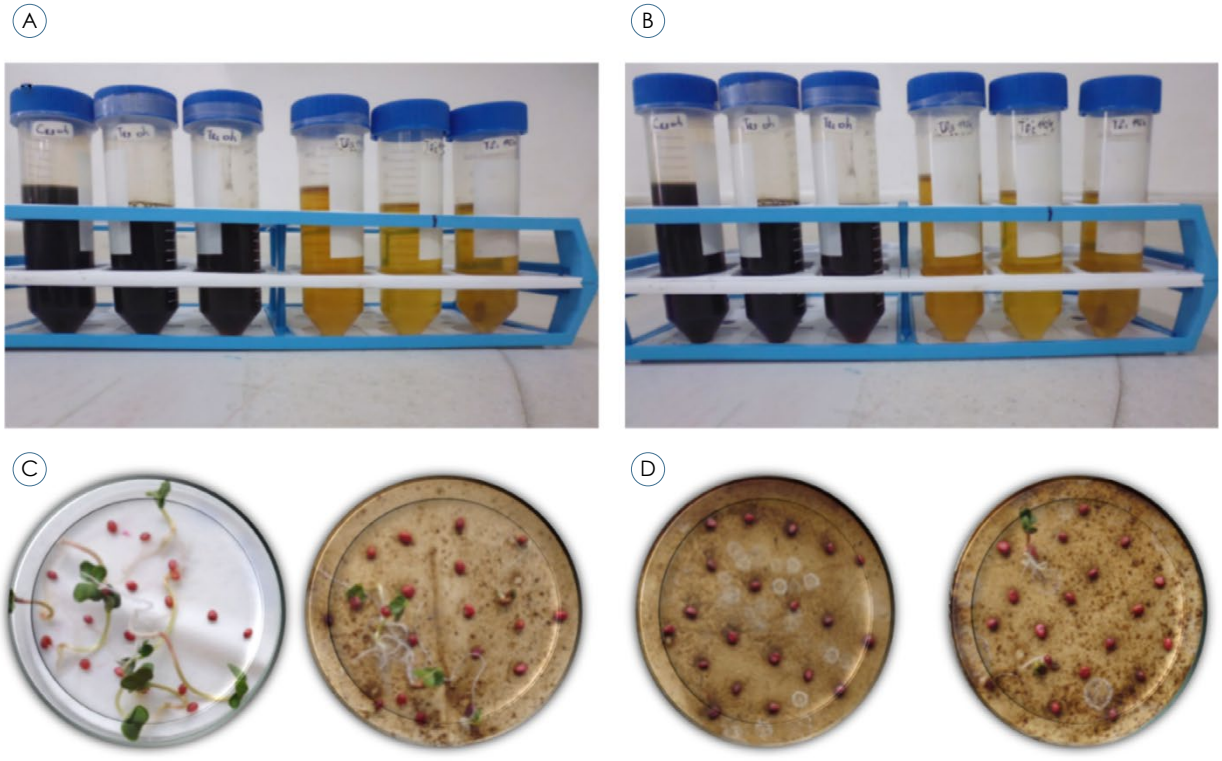
$$Indice\ de\ germinación\ (IG) = \frac{(\%G - \%L)}{100}$$

(Ecuación 36)

Dónde: (%G): porcentaje de germinación (% L) porcentaje de crecimiento de las raíces, ambos respecto al control hecho con agua destilada, y dividir por cien.

•Luego se reporta el porcentaje de germinación y se indica si el material es fitotóxico o no (Figura 30). Para indicar si un material es No fitotóxico el porcentaje de germinación debe ser superior al 85%. Cuando el material presenta características fertilizantes el índice de germinación es superior a 100%.

Figura 30.
Ensayos de fitotoxicidad para materiales orgánicos frescos y transformados.



12.5.4. Actividades enzimáticas

12.5.4.1. Actividad fosfatasa

- Pesar 10 g de material a investigar.
- Extraer la enzima con buffer MUB, pH 6,0.
- Filtrar con el papel filtro No 42.
- Recuperar la sobrenandante.
- En un tubo limpio colocar 250 µL del sustrato 4-*p-nitrofenil* fosfato (0,1 M) preparado en una solución buffer universal MUB a pH 7.0.
- Incubar por 1 hora a 37°C en baño serológico.
- Adicionar añadieron 360 µL de NaOH (0,5 M) y 86 µL de $CaCl_2$ (0,5 M) para detener la reacción enzimática.
- Centrifugar a 3578 x g por 10 min a 19°C.
- Leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 400 λ400 nm.
- Transformar a concentración de *p-nitrofenol* empleando la curva patrón (0,01 - 0,06 µmol/L).
- Calcular la actividad enzimática que se define como: una unidad fosfatasa (1UP) es igual a una µmoL min/L de *p-nitrofenol* liberado, bajo las condiciones de reacción.
- Relacionar con el peso de la muestra analizada para expresar en UP/g.

12.5.4.2. Amonio monoxigenasa

- Pesar 1 g de material a investigar.
- Colocarlos en erlemeyer de 100 mL que contiene 5 mL de Tris-HCL buffer (0.05M, pH 8.0).
- Agitar por 5 h a 30°C
- Filtrar con el papel filtro No 42.
- Recuperar la sobrenandante.
- En un tubo limpio colocar 1 mL de sobrenandante con 4 mL de buffer MUB a pH 6.0 o buffer fosfato y 1 mL de sulfato de amonio 200 mM.
- Incubar en agitación por 1 h a 35°C y 120 rpm.
- Frenar la reacción por refrigeración a 4°C por 5 minutos.
- Filtrar con papel filtro No 42.
- Transferir 1 mL del sobrenadane y adicionar 100 uL de Griess-Illosvay. Se forma un color rojo o rosado.
- Leer la absorbancia a 520 nm.
- Transformar la concentración de amonio empleando la curva patrón (0,01 - 0,06 µmol/L).
- Calcular la actividad enzimática que se define como: una unidad amonio monoxigenasa (1UP) es igual a una µmoL min/L de para *nitrofenol* liberado, bajo las condiciones de reacción.
- Relacionar con el peso de la muestra analizada para expresar en UP/g.

12.6. Referencias

Agriservice SPA, (2019). Procedimiento operativo estandarizado ASP009. Determinación de N-NH4 soluble en Purines y biodigestatos. Versión digital. 3 p. Santiago, Chile

Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, LM., Sánchez-Castro, N., Garzón-Jaramillo, R., Pedroza-Camacho, LD., Poutou-Piñales, RA., Rivera-Hoyos, CM., Díaz-Ariza, LA., Pedroza-Rodríguez, AM. (2020). Phosphate-solubilizing Pseudomonas sp. and Serratia sp., co-culture for Allium cepa L. growth promotion. Heliyon.

Beuchat. (2006). Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. British Food Journal. 38-53.

calFERT (California Food Emergency Response Team). (2008). Investigation of the Taco John´s Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with iceberg lettuce. Sacramento.

Emino, ER., Warman, PR. (2004). Biological assay for compost quality. Compost Science and Utilization. 12, 342-348.

Islam, MD. (2005). Survival of Escherichia coli O157: h7 in Soil and on Carrots and Onions Grown in Fields Trreated with Contaminated Manure Compost or Irrigation Water. Food Microbiology. 22, 63-70.

INS. (2011). Perfil de riesgo de Salmonella spp en pollo entero y en piezas. (C. R. Carrascal AK, Ed.) Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia.

LGMA. (2013). Commodity specific food safety guidelines for the production and harvest of lettuce and leafy greens. California, USA.

Martinez, M. (2020). Compost y materiales orgánicos efectos en la calidad de suelos y cultivos. Proceedings XII Congreso Internacional de Compostaje. Colombia Agosto 2020.

Ospina, PA., Romero-Perdomo, FA., Infante-González, NG., Paredes-Céspedes, DM., Pedroza-Rodríguez, AM., Quevedo-Hidalgo, B., Gutiérrez-Romero, V. (2020). Growth conditions and determination of Ammonia Monooxygenase (AMO) activity by cellular lysis in autotrophic and heterotrophic nitrifying strains. Revista Colombiana de Agronomía.

Marti, ST. (2013). Impact of manure fertilization on the abundande of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. . Applied and Environmental Microbiology. 5701-5709.

Reynells, S. (2016). Importance of Soil Amendments: Survival of Bacterial Pathogen in Manure and Compost Used as Organic Fertilizers. Microbiol Spectr, 1-13.

U.S. EPA. 2006. "Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium." EPA-821-R-06-14.

U.S. EPA. (September de 2004). Method 1680 Fecal Coliforms in Sewage Sludge (Biosolids) by Multiple-Tube Fermentation using Lauryl Tryptose Broth (LTB) and EC Medium.

U.S. EPA. (2006). "Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium.".

Wichuk, & McCartney. (2007). A review of the effectiveness of current time-temperatura regulation on pathogen inactivation during composting. Journal Enviromental Enginering Science, 572-586.

Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R.L, Herrera-Esttrella, A. (2011). Identification of mycoparasitism-related genes in Trichoderma atroviride. Applied Environmental Microbiology. 77, 4361-4370.

XRomán, P., Martinez, M., Pantoja, A. (2013). Manual del Compostaje del Agricultor. Experiencias en America de Chile. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura- FAO Santiago de Chile.

Capítulo 13

Aplicación ambiental de herramientas moleculares, ómicas y biología sintética



Capítulo 13

Aplicación ambiental de herramientas moleculares, ómicas y biología sintética

Claudia M. Rivera-Hoyos, Raúl A. Poutou-Piñales, Edwin D. Morales-Álvarez

13.1. Introducción

La mayor diversidad biológica entre los organismos vivos se encuentra en los microorganismos, que debido a su extraordinaria capacidad de adaptación genética y a las variaciones ambientales, han colonizado todos los ecosistemas. Sin embargo, cerca del 70-80% de la diversidad microbiana no es cultivable; situación que convierte a las técnicas moleculares y a los nuevos métodos de estudio en ecología microbiana en valiosas herramientas para comprender la función de los microorganismos en el medio ambiente y su posible utilidad con fines biotecnológicos (Bodor et al., 2020; Maertens et al., 2021).

Los desarrollos en las técnicas de separación celular, amplificación de ADN y plataformas de alto rendimiento para la secuenciación de ADN, han hecho posible el hallazgo de genes y genomas de microorganismos que antes no era posible estudiar, llevando al descubrimiento de nuevos genes de extremófilos, genomas enteros, operones de microorganismos no cultivables, nuevas enzimas o productos naturales con posibles aplicaciones biotecnológicas (Rashid & Stingl, 2015).

Las herramientas genómicas básicas que se han aplicado para estudiar las poblaciones y comunidades microbianas naturales, incluyen la secuenciación del ADN (Wang et al., 2020), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes (Wideman et al., 2021), los sistemas de clonación de ADN en diferentes organismos (Caparco et al., 2020; Díaz-Rincón et al., 2017; Rivera-Hoyos et al., 2015; Santana-Pereira et al., 2020), las técnicas de hibridización como la hibridación fluorescente in situ (FISH) (Aistleitner et al.,

2020; Kuo et al., 2020; Morono et al., 2020), así como las técnicas y programas para análisis bioinformáticos (Chen et al., 2020; Kherwa & Bansal, 2018). Recientemente, se han utilizado métodos novedosos que incluyen técnicas basadas en ARNr, metagenómica y metatranscriptómica (Knapik et al., 2020; Lott et al., 2020; Mukherjee & Reddy, 2020), así como el uso de microarreglos filogenéticos y funcionales (Lekang et al., 2020) con el fin de analizar muestras ambientales complejas.

Por otra parte, el estudio tradicional de los microorganismos se ha enfocado en el análisis de las rutas metabólicas individuales o de las respuestas moleculares individuales bajo condiciones específicas. Este enfoque ha sido de gran utilidad, pero, aunque ofrece información muy relevante, resulta en una aproximación reduccionista cuyo único objetivo podría ser un gen específico, un conjunto de genes o productos génicos, quedándose corto al no considerar la dinámica natural de los organismos, su comportamiento en comunidades y cómo una red de moléculas puede controlar el comportamiento ecológico de los mismos. En contraste, la ventaja de la Biología de Sistemas es que ofrece distintas metodologías para describir de forma integral la respuesta de un organismo a su entorno. Este nuevo campo de estudio reune otras ramas de las ciencias biológicas y ha sido potenciado por la revolución de las ciencias "Ómicas"; las cuales permiten caracterizar y cuantificar grandes grupos de moléculas. Dicha caracterización, también implica la necesidad de una elevada capacidad de almacenamiento y análisis de cantidades masivas de información en computadores, por lo que la comprensión de sistemas biológicos completos también ha evolucionado a la par con el poder de cómputo y las herramientas bioinformáticas (Madigan et al., 2019).

El desarrollo alcanzado en distintos campos de la biología y la bioinformática ha llevado al uso y diseño de herramientas que involucran también la ingeniería, dando como resultado a la hoy llamada Biología Sintética, que integra la biología molecular y la ingeniería para diseñar y construir nuevos componentes biomoleculares, redes y rutas metabólicas (Benner & Sismour, 2005; Ren et al., 2020); lo que hace con el objetivo de reprogramar o sintetizar organismos completos. Este nuevo campo se basa la concepción transformadora de que todos estos enfoques pueden utilizarse tanto para estudiar sistemas celulares como para facilitar su manipulación con interés productivo (Meng & Ellis, 2020). Si bien la capacidad de diseñar microorganismos racionalmente ha existido desde hace más de medio siglo, con la revolución de la genómica y posteriormente con la biología de sistemas en la década de 1990, la biología sintética surgió como una disciplina rigurosa de ingeniería para diseñar, controlar y programar el comportamiento celular (Cameron et al., 2014).

En este orden de ideas, la biología sintética es considerada una extensión de la tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética, reconocida desde la década de 1970. Tecnología que ha sido el motor del desarrollo biotecnológico y que continua en ascenso; lo que es evidente si se tienen en cuenta las reducciones drásticas en los costos en secuenciación y síntesis de ADN, cebadores y sondas, así como por el desarrollo de herramientas de punta para la edición del genoma, como el sistema CRISPR/Cas9 (Montecillo et al., 2020; Tyagi et al., 2020; Zhang et al., 2021; Zhao et al., 2020). Los enfoques de la biología sintética ya se han aplicado a la ingeniería metabólica de microorganismos para la producción de moléculas de importancia industrial y se muestran prometedores para acelerar el descubrimiento y desarrollo de nuevos metabolitos secundarios de interés, por ejemplo, para abordar problemas actuales en salud humana, el suministro mundial de alimentos, la producción de energías renovables y de enzimas con relevancia ambiental, entre otros (Katz et al., 2018).

Uno de los mayores retos en microbiología ambiental consiste en entender el impacto los ambientes perturbados sobre la actividad de las comunidades microbianas nativas y en el vínculo con la diversidad genética y funcional integrado al funcionamiento de los ecosistemas, lo que implica análisis a distintas escalas y de distintos componentes (densidad, diversidad, función, actividad, interacciones).

En este capítulo, se resumen algunos de los aspectos fundamentales para el estudio

de las comunidades microbianas basado en el uso de herramientas moleculares, ciencias ómicas, biología de sistemas y biología sintética. Herramientas y áreas que, en conjunto con las técnicas clásicas de estudio en microbiología, favorecen la comprensión de la función que desempeñan los microorganismos en el medio ambiente y su posible utilidad con fines biotecnológicos.

13.2. Investigación del genoma

El genoma corresponde a la totalidad de la información genética, incluyendo los genes codificantes, ARNs y secuencias reguladoras, así como las secuencias no codificantes. La genómica, se refiere a la disciplina encargada de mapear, secuenciar, analizar y comparar los genomas (Madigan et al., 2019). Se han secuenciado varios miles de genomas y el número continúa en aumento ya que con frecuencia aparecen nuevos avances en las técnicas de secuenciación. Hoy en día se cuenta con las secuencias de ADN de más de 50.000 Bacterias, Arqueas y Virus, muchas de ellas consignadas en bases de datos de proyectos metagenómicos a las cuales se puede acceder de forma gratuita como "*Genomes OnLine Database*" (https://gold.jgi.doe.gov) que es un recurso en línea para el acceso integral a la información sobre proyectos de secuenciación genómica, metagenómica y los metadatos asociados, en todo el mundo.

Estudiar los genomas microbianos ha permitido avances en numerosos campos, desde el descubrimiento de genes que codifican enzimas resistentes a ambientes extremos como las presentes en microorganismos termofílicos, hasta genes que codifican para factores de virulencia en numerosos patógenos (Bouchez et al., 2016). Ha contribuído también al desarrollo o perfeccionamiento de técnicas, por ejemplo, en el diseño de microarreglos para el estudio de la expresión génica, la detección de eventos de transferencia horizontal de genes, el descubrimiento de CRISPR, el entendimiento de rutas metabólicas o al diseño de medios de cultivo basados en los requerimientos específicos de los microorganismos (Li et al., 2020; Liu & Li, 2020; Lujan et al., 2020; Zhao et al., 2021).

El estudio del genoma inicia con la secuenciación de ADN, que se refiere a la determinación del orden preciso (secuencia) en el que están alineados los nucleótidos. La secuenciación se considera el corazón de la revolución de las ómicas y su tecnología avanza con rapidez, ya que cada año aparecen nuevos métodos y los costos continúan disminuyendo, lo que ha facilitado el acceso a estas tecnologías. En la Tabla 15 se resumen los principales métodos de secuenciación.

Tabla 15

Métodos de secuenciación del ADN.

Generación	Método	Características	Referencias
Primera generación	Método desoxi de Sanger (radioactividad o fluorescencia; amplificación del ADN)	Tamaño de lectura: 700-900 bases	(Sanger & Coolson, 1977)
Segunda generación	Pirosecuenciación 454 (fluorescencia; amplificación del ADN; masiva en paralelo)	Tamaño de lectura: 400-500 bases	(Bibi & Azhar, 2021)
	Método Illúmina/ Solexa (fluorescencia; amplificación del ADN; masiva en paralelo)	Tamaño de lectura: 50-100 bases	(Argenta et al., 2021)
	Método SOLiD (fluorescencia; amplificación del ADN; masiva en paralelo)	Tamaño de lectura: 50-100 bases	(Pandey et al., 2021)

Tabla 15

Métodos de secuenciación del ADN.

Generación	Método	Características	Referencias
Tercera generación	Secuenciación de una sola molécula, HeliScope (fluorescencia; única molécula de ADN)	Tamaño de lectura: hasta 55 bases (mejora la exactitud para ADN fósil)	(Shi et al., 2021)
	Secuenciación SMRT, Pacific Biosciences (fluorescencia; única molécula de ADN; guíade onda de "modo cero" o ZMW)	Tamaño de lectura: 2500-3000 bases	(Gallardo-Escarate et al., 2021)
Cuarta generación	Scuenciación por Ion Torrent (cambios iónicos por pH; amplificación de ADN)	Tamaño de lectura: 100-200 bases	(Fujita et al., 2021)
	Secuenciación por nanoporos, Oxford Nanopore (corriente eléctrica; única molécula de ADN; tiempo real)	Tamaño de lectura: miles de bases	(Liem et al., 2021)

Tomado y modificado de (Madigan et al., 2019; Rashid & Stingl, 2015)

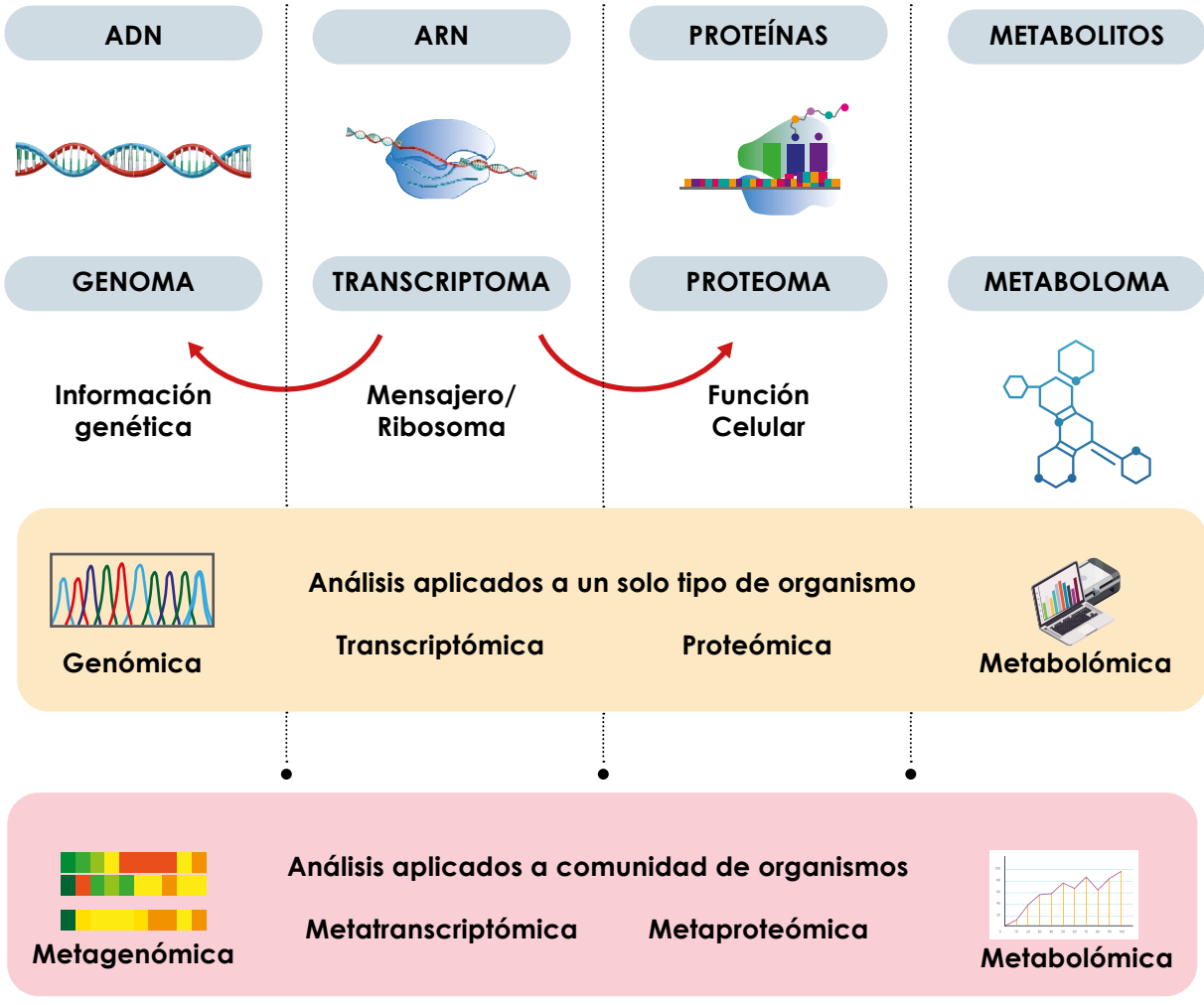
Independientemente del método de secuenciación utilizado, el paso siguiente en el estudio de los genomas corresponde al ensamblaje y anotación del genoma, que consiste en poner los fragmentos obtenidos en el orden correcto, basados en el solapamiento de algunas regiones para después eliminar los solapamientos (Boivin et al., 2020; Chen et al., 2020; Necsulea, 2020). A continuación, la secuencia genómica ensamblada será útil siempre y cuando sea anotada con el fin de identificar genes y regiones funcionales, donde el uso de herramientas bioinformáticas resulta fundamental para almacenar y analizar las secuencias y estructuras de los ácidos nucléicos y de las proteínas. Debido al avance en los métodos de secuenciación, se están generando datos más rápido de lo que pueden ser analizados adecuadamente; por lo tanto, la anotación continúa siendo el cuello de botella de la genómica. Con esta información, pueden obtenerse los *Open Reading Frames* (ORFs) o marcos de lectura abiertos, que consisten en las regiones que codifican para una proteína y que pueden ser identificados realizando búsquedas computarizadas para encontrar los codones de inicio y de parada en los *ORFs* (Boivin et al., 2020; Chen et al., 2020; Necsulea, 2020).

Finalmente, pese al gran esfuerzo necesario para generar la secuencia registrada de un genoma, el resultado es un "listado de piezas", y para entender cómo funcionan las células, es necesario conocer mucho más que los genes presentes. Se requiere entonces, entender la expresión de genes, la función de los productos génicos, la función de las proteínas obtenidas, intermediarios metabólicos y metabolitos que se producen durante el crecimiento celular, entre otros, lo que dió lugar al campo de la genómica funcional (Cordier et al., 2020; Goldberg & Parsley, 2020).

13.3. Genómica funcional

La genómica funcional utiliza los datos genómicos para estudiar la expresión y función de genes y proteínas a escala global (en todo el genoma o en todo el sistema), centrándose en la transcripción génica, la traducción y las interacciones proteína-proteína, para lo cual se utilizan métodos de alto rendimiento (Boolchandani et al., 2019). Por analogía con el término "genoma", el complemento entero de ARN producido bajo determinadas condiciones ambientales se conoce como "transcriptoma". Una terminología similar se aplica a los productos de la traducción, el metabolismo y otras áreas relacionadas, añadiendo el sufijo "ómica" (Figura 31).

Figura 31.
Diferentes niveles de integración (ADN, ARN, proteínas y metabolitos) en las técnicas de microbiología molecular para el estudio de un solo tipo de microorganismo o comunidades microbianas.



La metagenómica corresponde al estudio de las secuencias genómicas de la totalidad de los organismos presentes en una muestra o en un ambiente particular, donde se encuentran microorganismos cultivables y no cultivables. Algunos ejemplos de estudios metagenómicos enfocados en la microbiología ambiental involucran el análisis de ambientes extremos como los drenajes ácidos de minas, que pueden tener una poca diversidad de especies y de difícil cultivo y que debido a la metagenómica ha sido posible aislar el ADN de las comunidades allí presentes (Breitwieser & Salzberg, 2020; Fadiji & Babalola, 2020; Luan et al., 2020; Ribeiro Duarte et al., 2020; Rodriguez et al., 2020). En contraste, el estudio de ambientes complejos como los suelos fértiles o ambientes acuáticos son un reto para la metagenómica precisamente por la alta diversidad de especies presentes, haciendo difícil el ensamblaje y manejo de gran cantidad de información. Al final de este capítulo, se propone una metodología para la aplicación de técnicas de análisis metagenómico para el estudio de la distribución temporal y espacial de comunidades microbianas presentes en columnas de Winogradsky (Capítulo 7 – Ciclo del Azufre). El estudio metagenómico, puede combinarse con la búsqueda de grupos funcionales específicos que brinden orientación con respecto a procesos microbianos importantes en la microbiología ambiental. En la Tabla 16 se presentan algunos de los genes de uso frecuente para la evaluación de procesos microbianos.

Tabla 16

Genes de uso frecuente para la evaluación de grupos funcionales microbianos específicos en una muestra ambiental.

Proceso metabólico	Gen	Enzima codificada	E.C.	Referencias
Desnitrificación	*nar*G	Nitrato reductasa	1.7.1.1	(Unda-Calvo et al., 2019)
	*nir*K, *nir*S	Nitrito reductasa	1.7.1.4	(Wise et al., 2020)
	*nor*B	Óxido nítrico reductasa	1.7.1.14	(Torregrosa-Crespo et al., 2017)
	*nos*Z	Óxido nitroso reductasa	1.7.2.4	(Carreira et al., 2020)
Fijación de nitrógeno	*nif*H	Nitrogenasa	1.18.6.1	(Luxem et al., 2020)
Nitrificación	*amo*A	Amoniaco monooxigenasa	1.14.99.39	(Li et al., 2021)
Oxidación de metano	*pmo*A	Metano monooxigenasa	1.14.13.25	(Wallenius et al., 2021)
Reducción de sulfato	*apr*A	Adenosina 5-fosfosulfato reductasa	1.8.99.2	(Meyer & Kuever, 2007)
	*dsra*B	Sulfito reductasa	1.8.99.5	(Pineau et al., 2008)
Producción de metano	*mcr*A	Metilcoenzima M-reductasa	2.8.4.1	(Hua et al., 2019)
Degradación de compuestos de petróleo	*nah*A	Naftaleno dioxigenasa	1.14.12.12	(Yang et al., 2014)
	*alk*B	Alcano hidroxilasa	1.14.15.3	(Van Beilen et al., 2006)
Fotosíntesis anoxigénica	*puf*M	Subunidad M del centro de reacción fotosintético		(Código UniProtp0C0y9)

Tomado y modificado de (Madigan et al., 2019)

La transcriptómica, por otra parte, se refiere al estudio global de la transcripción y se lleva a cabo mediante el análisis de todo el ARN generado en condiciones de crecimiento diferentes. En los estudios transcriptómicos se pueden usar micromatrices, que dependen de la hibridación entre el ADN y el ARN, o mediante la secuenciación de ARN (ARN-Seq) que depende de métodos de secuenciación de segunda generación o posteriores (Bouchez et al., 2016). Las micromatrices son pequeños soportes sólidos sobre los que se fijan y se disponen espacialmente según un patrón conocido, genes o porciones de genes. Esta tecnología requiere de la hibridación entre el ADN y el ARN. Los fragmentos de ácidos nucléicos de cadena simple y cuya identidad se conoce se denominan "sondas" y suelen ser radioactivas o fluorescentes. Estos chips génicos son de utilidad en distintos campos, dependiendo de los genes que se encuentren fijados al chip. La expresión génica global se controla mediante el ensamblado de una matriz de oligonucleótidos complementarios

a cada gen en el genoma y usando luego la población completa de ARNm como muestra (Madigan et al., 2019). El análisis por ARN-seq, es un método donde se tienen todas las moléculas de ARN de una célula (para lo cual se requiere que la secuencia genómica esté disponible); este método no sólo indicará qué genes se transcriben sino cuántas copias de ARN se obtienen. Es un método dispendioso ya que el ARN más abundante en la célula es es ARN ribosomal, por lo que debe eliminarse dicho ARN o aumentar la cantidad de ARNm en la mezcla inicial de ARN total. Sin embargo, debido al progreso en los métodos de secuenciación, el ARN-seq se está convirtiendo en el métodos de elección para estudios globales de expresión de genes (Chazarra-Gil et al., 2021; Franzen & Bjorkegren, 2020; Su et al., 2020; Yang et al., 2020).

Avanzando en los niveles de integración de los estudios moleculares, la proteómica se refiere al estudio a nivel de todo el genoma de la estructura, la función y la regulación de las proteínas de un organismo. Y su estudio en relación con el transcriptoma es señalar las enzimas realmente responsables de la actividad de la comunidad en condiciones específicas. El primer enfoque de la proteómica inició con el uso de la electroforesis bidimensional (2D) en gel de poliacrilamida. Esta técnica permite separar, identificar y estimar la abundancia de todas las proteínas presentes en una muestra celular. Alternativamente, en la versión preparativa de la técnica, las proteínas pueden eluirse e identificarse por espectrometría de masas para obtener un espectro característico de cada organismo (Bouchez et al., 2016). Sin embargo, en la actualidad se usa cada vez más la cromatografía líquida para separar mezclas de proteínas, siendo la cromatografía líquida de alta resolución o alta presión (HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*) la más usada. En esta técnica, la muestra se disuelve en el solvente adecuado y se pasa mediante presión por una columna empaquetada que constituye la fase estacionaria, que separa las proteínas por las variaciones en sus propiedades químicas como el tamaño, la carga iónica o la hidrofobicidad. Las fracciones se recuperan a la salida de la columna y las proteínas de cada fracción se digieren con proteasas para identificar por espectrometría de masas los péptidos que se generan (Knight et al., 2018). Finalmente, la proteómica comparativa derivada de la proteómica estructural, permite modelar la estructura de una proteína desconocida si está disponible la estructura 3D de una proteína cuya secuencia de aminoácidos coincida con ella al menos en el 30 % de sus secuencias. Para ello, es indispensable el uso de herramientas bioinformáticas y el punto de partida sería la base de datos de estructuras de proteínas, para la cual el acceso es libre (Protein Data Bank: https://www.rcsb.org).

La integración entre la proteómica y la genómica ofrece pistas importantes sobre la relación entre la expresión génica y la influencia de los estímulos ambientales sobre los organismos y las comunidades microbianas. Información fundamental para la investigación básica que puede tener efecto en la medicina, la agricultura (Bakshi et al., 2020), la biotecnología y la protección del medio ambiente. Áreas en las que el conocimiento de la conexión entre el genoma y el proteoma y de cómo se regula esta conexión puede ayudar a solucionar problemas ambientales, así como aportar beneficios en la productividad agrícola. Finalmente, la metabolómica estudia los metabolitos sintetizados por los organismos y las comunidades microbianas y puede ser de utilidad para identificar los productos finales o intermediarios derivados de su actividad metabólica (Knight et al., 2018). Una de las técnicas más usadas para el análisis metabolómico corresponde a una variante de la espectrometría de masas, que combina la espectrometría de masas y el tiempo de vuelo de los iones generados durante el análisis: MALDI-TOF (del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization* y *time of flight*) (Kim et al., 2021; Weis et al., 2020).

13.4. Biología de sistemas

La biología de sistemas consiste en la integración de los datos de la genómica y otras ómicas para construir una visión general de un sistema biológico (Bouchez et al., 2016). Poder almacenar y analizar una gran cantidad de datos es indispensable y la bioinformática es esencial para este propósito, para la comprensión de sistemas biológicos completos, razón por la que está evolucionando en paralelo y adquiriendo la

potencia y la capacidad de almacenamiento y manejo de datos en los ordenadores. La estrategia básica de la biología de sistemas es reunir un conjunto de datos ómicos y a partir de ellos construir modelos informáticos del sistema de estudio. Estas observaciones permiten predecir el comportamiento o las propiedades de un organismo o comunidad que no eran observables con los estudios preliminares. Una base de datos útil para tal fin es la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG: https://www.genome.jp/kegg/), que es una base de datos para comprender las funciones y utilidades de alto nivel de los sistemas biológicos, como la célula, el organismo y el ecosistema, a partir de información molecular, especialmente conjuntos de datos moleculares a gran escala, generados por la secuenciación del genoma y otras tecnologías de alto rendimiento, donde incluso se encuentran módulos de los mapas y rutas metabólicas de una gran cantidad de organismos.

13.5. Ingeniería genética y biología sintética

La ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante comprende múltiples técnicas para la manipulación del material genético con el fin de alterar, reparar o mejorar la función de los organismos o para la producción de moléculas de interés biotecnológico (Yan & Fong, 2017). El término biología sintética hace referencia al uso de la ingeniería genética para crear nuevos sistemas biológicos a partir de partes biológicas disponibles, obtenidas a partir de uno o varios organismos. Estas partes biológicas (promotores, *enhancers*, operadores, riboswitches, proteínas reguladoras, señales de secreción, terminadores de la transcripción, dominios enzimáticos, etc.) se denominan biobloques (del inglés biobricks) como analogía a los bloques de construcción para construir un edificio (Meng & Ellis, 2020). La biología sintética se encarga de unir estos bloques en varias combinaciones para formar módulos funcionales, capaces de generar comportamientos más complejos.

Anualmente, se lleva a cabo una competencia mundial para incentivar ideas basadas en la biología sintética que puedan resolver problemas biotecnológicos, ambientales y en distintas áreas del conocimiento. Estas iniciativas van desde el diseño de productos biodegradables a partir de organismos modificados hasta el diseño de microrganismos como E. coli con la capacidad de proteger a las abejas de los parásitos (*International Genetically Engineered Machine*–iGEM:http://igem.org/). Recientemente, los avances en la edición de genomas como el uso de herramientas de CRISPR/Cas9 han permitido editar el ADN de animales, plantas y microorganismos con una precisión extremadamente alta; impactando de forma revolucionaria la velocidad para generar nuevo conocimiento ya que las técnicas tradicionales para la modificación de genomas solían ser dispendiosas y demoradas. Ahora, debido a la disponibilidad de nuevas técnicas de edición genética es posible cambiar el código de una vida en el transcurso de unas pocas semanas. Este descubrimiento significó el Premio Nobel de química en el año 2020 (Uyhazi & Bennett, 2021) y no ha parado de evolucionar revolucionar los campos de la ingeniería genética y la biología sintética.

13.6. Protocolo básico para el análisis de la distribución temporal y espacial de comunidades microbianas en un modelo de ecosistema como las columnas de Winogradsky

Las columnas de Winogradsky representan un ecosistema microbiano modelo, preparados mediante la adición de sedimentos a un cilindro transparente con suplementos adicionales e incubados en presencia de luz (Capítulo 7 – Ciclo del Azufre). Los gradientes ambientales se desarrollan dentro de la columna, creando diversos nichos que permiten el enriquecimiento de bacterias específicas, simulando un ecosistema natural (Céspedes-Bernal et al., 2021). El cultivo enriquecido poblacionalmente se puede usar par estudiar la estructura y función de las comunidades bacterianas. Para ello, se puede llevar a cabo el estudio del gen 16S que codifica para ARN ribosomal 16S y así caracterizar la dinámica de la comunidad microbiana durante la evolución de la columna y determinar la tasa de cambio de la comunidad en el tiempo, por ejemplo, entre 60 y 90 días.

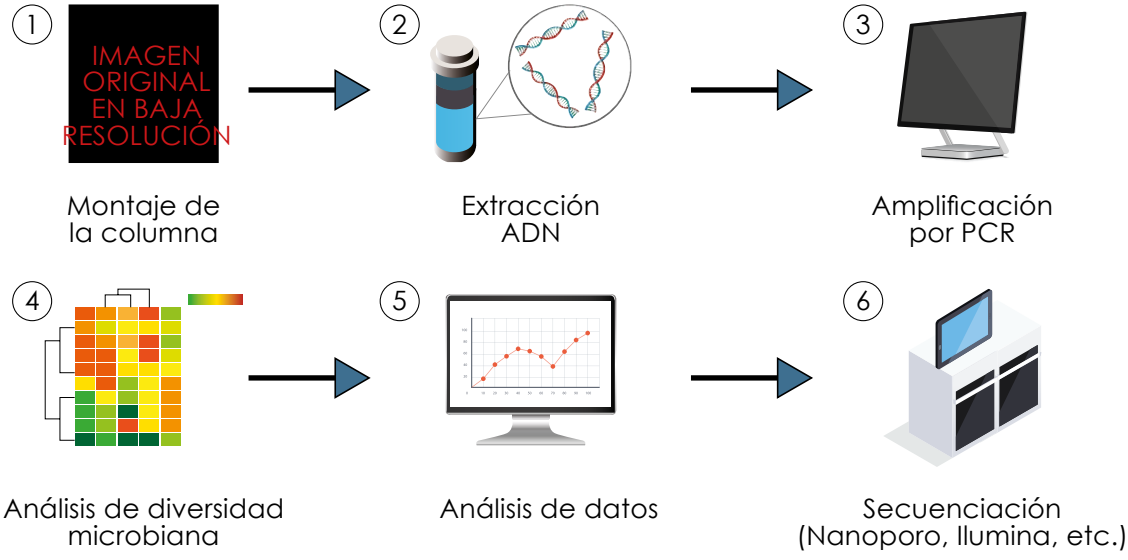
Esteban et al., (2015) estudiaron columnas de Winogradsky durante 60 días y encontraron que la comunidad microbiana cambió en comparación con la muestra inicial. Donde la

población de las cianobacterias, Chloroflexi, Nitrospirae y Planctomycetes se incrementó relativamente con el tiempo, mientras que la mayoría de las Proteobacterias disminuyeron su población relativa. Entre el 67 y 72 % de la comunidad de superficie estaba compuesta por taxones altamente enriquecidos que eran raros y escasos en la muestra inicial, incluidas la cianobacteria Anabaena, un miembro del filo Gemmatimonadetes y un miembro del grupo Chloroflexi clase Anaerolinea. Concluyendo que los taxones raros pueden llegar a ser abundantes en condiciones ambientales apropiadas y apoyando la hipótesis de que los taxones raros pueden incrementar su población en estos modelos ecológicos controlados. Lo que, a futuro, podría ser una fuente para estudios prospectivos que permitan el descubrimiento de microorganismos, genes o moléculas de interés biotecnológico. La metodología general para el estudio de la distribución temporal y espacial de comunidades microbianas en columnas de Winogradsky se describe en la Figura 32.

En detalle, el protocolo para el análisis genómico de la comunidad bacteriana presente en las columnas debe incluir la extracción, amplificación y secuenciación del ADN para luego proceder con el análisis de la diversidad microbiana. La extracción de ADN se puede realizar usando entre 40-100 mg de sedimento utilizando el kit de purificación de ADN *MoBio PowerSoil* (MoBio, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La región V4 del gen 16S rADN se puede amplificar por PCR usando una polimerasa de alta fidelidad y cebadores con código de barras 515F (5´-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3´) y 806R (5´-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3´) con secuencias de adaptadores de células de flujo al sistema Illumina. Según Esteban et al., (2015) cada reacción de 25 µl debe contener 2 µl del ADN genómico extraído, solución potenciadora a una concentración final del 2X, 0,8 µM de cada cebador, 1 mM MgSO4, 0,3 mM dNTPs y tampón de PCR a concentración final 1X. Para la PCR se proponen las siguientes condiciones: una partida en caliente de 94 °C durante 5 minutos, luego 32 ciclos (94°C durante 15 s, 50 °C durante 45 s, 6 °C durante 30 s). La secuenciación se puede realizar usando MiSeq de Illumina para generar lecturas de extremo emparejado (Esteban et al., 2015). Finalmente, con los datos obtenidos se debe continuar con el ensamblaje y anotación de las secuencias para poder realizar los cálculos de diversidad alfa usando índices como el de Shannon, la riqueza de unidades taxonómicas experimentales (OTUs) y otros índices de diversidad de poblaciones (Gauthier & Derome, 2021).

Figura 32.
Esquema general para el estudio de la distribución temporal y espacial de las comunidades microbianas en Columnas de Winogradsky.



13.7. Referencias

Aistleitner, K., Sieper, T., Sturz, I., Jeske, R., Tritscheller, S., Mantel, S., Tscherne, A., Zange, S., Stoecker, K., & Wolfel, R. (2020). NOTIFy (non-toxic lyophilized field)-FISH for the identification of biological agents by Fluorescence in situ Hybridization. Plos One, 15(3), e0230057. https://doi.org/http://doi.org/10.1371/journal.pone.0230057

Argenta, T. S., Barros, A. R. M., de Carvalho, C. A., Dos Santos, A. B., & Firmino, P. I. M. (2021, Jan 20). Parabens in aerobic granular sludge systems: Impacts on granulation and insights into removal mechanisms. Science of Total Environment, 753, 142105. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142105

Bakshi , A., Moin, M., & Madhav, M. S. (2020). Metagenomics in Agriculture: State-of-the-Art. In R. S. Chopra, C. Chopra, & N. R. Sharma (Eds.), Metagenomics: Techniques, Applications, Challenges and Opportunities (pp. 167-187). Springer. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/978-981-15-6529-8_11

Benner, S. A., & Sismour, A. M. (2005, Jul). Synthetic biology. Nature Review in Genetics, 6(7), 533-543. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/nrg1637

Bibi, F., & Azhar, E. I. (2021, Jan). Analysis of bacterial communities in sponges and coral inhabiting Red Sea, using barcoded 454 pyrosequencing. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(1), 847-854. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.021

Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Erdeiné Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., Szilágyi, Á., Kovács, T., Perei, K., & Rákhely, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 19(1), 1-22. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4

Boivin, V., Reulet, G., Boisvert, O., Couture, S., Elela, S. A., & Scott, M. S. (2020, Mar 18). Reducing the structure bias of RNA-Seq reveals a large number of non-annotated non-coding RNA. Nucleic Acids Research, 48(5), 2271-2286. https://doi.org/http://doi.org/10.1093/nar/gkaa028

Boolchandani, M., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2019, Jun). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. Nature Review in Genetics, 20(6), 356-370. https://doi.org/http://doi.org/10.1038/s41576-019-0108-4

Bouchez, T., Blieux, A. L., Dequiedt, S., Domaizon, I., Dufresne, A., Ferreira, S., Godon, J. J., Hellal, J., Joulian, C., Quaiser, A., Martin-Laurent, F., Mauffret, A., Monier, J. M., Peyret, P., Schmitt-Koplin, P., Sibourg, O., D'oiron, E., Bispo, A., Deportes, I., Grand, C., Cuny, P., Maron, P. A., & Ranjard, L. (2016). Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. Environmental Chemistry Letters, 14(4), 423-441. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s10311-016-0581-3

Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2020, Feb 15). Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. Bioinformatics, 36(4), 1303-1304. https://doi.org/http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz715

Cameron, D. E., Bashor, C. J., & Collins, J. J. (2014, May). A brief history of synthetic biology. Nature Review in Microbiology, 12(5), 381-390. https://doi.org/http://doi.org/10.1038/nrmicro3239

Caparco, A. A., Pelletier, E., Petit, J. L., Jouenne, A., Bommarius, B. R., Berardinis, V., Zaparucha, A., Champion, J. A., Bommarius, A. S., & Vergne-Vaxelaire, C. (2020). Metagenomic Mining for Amine Dehydrogenase Discovery. Advanced Synthesis & Catalysis, 362(12), 2427-2436. https://doi.org/http://doi.org/10.1002/adsc.202000094

Carreira, C., Nunes, R. F., Mestre, O., Moura, I., & Pauleta, S. R. (2020, Oct). The effect of pH on Marinobacter hydrocarbonoclasticus denitrification pathway and nitrous oxide reductase. Journal of Biology and Inorganic Chemistry, 25(7), 927-940. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00775-020-01812-0

Céspedes-Bernal, D. N., Mateus-Madonado, J. F., Rengel-Bustamante, J. A., Quintero-Duque, M. C., Rivera-Hoyos, C. M., Poutou-Piñales, R. A., Díaz-Ariza, L. A., Castillo-Carvajal, L. C., Páez Morales, A. I., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2021). Non-domestic wastewater treatment

with fungal/bacterial consortium followed by Chlorella sp., and thermal conversion of the generated sludge. 3Biotech, 11(5), Article: 227. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s13205-021-02780-1

Chazarra-Gil, R., van Dongen, S., Kiselev, V. Y., & Hemberg, M. (2021, Apr 19). Flexible comparison of batch correction methods for single-cell RNA-seq using BatchBench. Nucleic Acids Research, 49(7), e42. https://doi.org/http://doi.org/10.1093/nar/gkab004

Chen, C., Hou, J., Tanner, J. J., & Cheng, J. (2020, Apr 20). Bioinformatics Methods for Mass Spectrometry-Based Proteomics Data Analysis. International Journal of Molecular Science, 21(8), 2873. https://doi.org/http://doi.org/10.3390/ijms21082873

Cordier, T., Alonso-Saez, L., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Aylagas, E., Bohan, D. A., Bouchez, A., Chariton, A., Creer, S., Fruhe, L., Keck, F., Keeley, N., Laroche, O., Leese, F., Pochon, X., Stoeck, T., Pawlowski, J., & Lanzen, A. (2020, May 16). Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: A review of current strategies with an implementation roadmap. Molecular Ecology, IN PRESS. https://doi.org/http://doi.org/10.1111/mec.15472

Díaz-Rincón, D. J., Duque, I., Osorio, E., Rodríguez-López, A., Espejo-Mojica, A., Parra-Giraldo, C. M., Poutou-Piñales, R. A., Alméciga-Díaz, C. J., & Quevedo-Hidalgo, B. (2017). Production of Recombinant Trichoderma reesei Cellobiohydrolase II in a New Expression System Based on Wickerhamomyces anomalus. Enzyme Research, 2017, Article ID 6980565.

Esteban, D. J., Hysa, B., & Bartow-McKenney, C. (2015). Temporal and spatial distribution of the microbial community of winogradsky columns. PLoS One 10(8), e0134588. https://doi.org/http://doi.org/10.1371/journal.pone.0134588

Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020, Mar). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. Journal of Microbiology Methods, 170, 105860. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105860

Franzen, O., & Bjorkegren, J. L. M. (2020, Jun 1). alona: a web server for single-cell RNA-seq analysis. Bioinformatics, 36(12), 3910-3912. https://doi.org/http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa269

Fujita, S., Masago, K., Sasaki, E., Tsukushi, S., Horio, Y., Kuroda, H., & Hida, T. (2021, Mar-Apr). Weak-evidence Fusion Candidates Detected by a FusionPlex Assay Using the Ion Torrent System. In Vivo, 35(2), 993-998. https://doi.org/https://doi.org/10.21873/invivo.12342

Gallardo-Escarate, C., Valenzuela-Munoz, V., Nunez-Acuna, G., Valenzuela-Miranda, D., Goncalves, A. T., Escobar-Sepulveda, H., Liachko, I., Nelson, B., Roberts, S., & Warren, W. (2021, Feb 11). Chromosome-scale genome assembly of the sea louse Caligus rogercresseyi by SMRT sequencing and Hi-C analysis. Science Data, 8(1), 60. https://doi.org/http://doi.org/10.1038/s41597-021-00842-w

Gauthier, J., & Derome, N. (2021, Apr 7). Evenness-Richness Scatter Plots: a Visual and Insightful Representation of Shannon Entropy Measurements for Ecological Community Analysis. mSphere, 6(2), e01019-01020. https://doi.org/http://doi.org/10.1128/mSphere.01019-20.

Goldberg, C. S., & Parsley, M. B. (2020). Environmental Population Genomics: Challenges and Opportunities. In P. A. Hohenlohe & O. P. Rajora (Eds.), Population Genomics: Wildlife (pp. 101-113). Springer. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/13836_2020_75

Hua, Z. S., Wang, Y. L., Evans, P. N., Qu, Y. N., Goh, K. M., Rao, Y. Z., Qi, Y. L., Li, Y. X., Huang, M. J., Jiao, J. Y., Chen, Y. T., Mao, Y. P., Shu, W. S., Hozzein, W., Hedlund, B. P., Tyson, G. W., Zhang, T., & Li, W. J. (2019, Oct 8). Insights into the ecological roles and evolution of methyl-coenzyme M reductase-containing hot spring Archaea. Nature Communication, 10(1), 4574. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-12574-y

Katz, L., Chen, Y. Y., Gonzalez, R., Peterson, T. C., Zhao, H., & Baltz, R. H. (2018, Jul). Synthetic biology advances and applications in the biotechnology industry: a perspective. Journal of Indistrial Microbiology and Biotechnology, 45(7), 449-461. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s10295-018-2056-y

Kherwa, P., & Bansal, P. (2018). Topic Modeling: A Comprehensive Review. ICST Transactions on Scalable Information Systems, 0(0), 159623. https://doi.org/http://doi.org/10.4108/eai.13-7-2018.159623

Kim, E., Cho, E. J., Yang, S. M., Kim, M. J., & Kim, H. Y. (2021, Apr). Novel approaches for the identification of microbial communities in kimchi: MALDI-TOF MS analysis and high-throughput sequencing. Food Microbiology, 94, 103641. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103641

Knapik, K., Bagi, A., Krolicka, A., & Baussant, T. (2020, May 15). Metatranscriptomic Analysis of Oil-Exposed Seawater Bacterial Communities Archived by an Environmental Sample Processor (ESP). Microorganisms, 8(5), 744. https://doi.org/http://doi.org/10.3390/microorganisms8050744

Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhu, Q., Caporaso, J. G., & Dorrestein, P. C. (2018, Jul). Best practices for analysing microbiomes. Nature Review in Microbiology, 16(7), 410-422. https://doi.org/http://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9

Kuo, J. T., Chang, L. L., Yen, C. Y., Tsai, T. H., Chang, Y. C., Huang, Y. T., & Chung, Y. C. (2020, Dec 24). Development of Fluorescence In Situ Hybridization as a Rapid, Accurate Method for Detecting Coliforms in Water Samples. Biosensors (Basel), 11(1), 8. https://doi.org/http://doi.org/10.3390/bios11010008

Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E., & Troedsson, C. (2020, May). Evaluation of a eukaryote phylogenetic microarray for environmental monitoring of marine sediments. Marine Pollution Bulletin, 154, 111102. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111102

Li, J., Tang, Q., Li, Y., Fan, Y. Y., Li, F. H., Wu, J. H., Min, D., Li, W. W., Lam, P. K. S., & Yu, H. Q. (2020, Mar 17). Rediverting Electron Flux with an Engineered CRISPR-ddAsCpf1 System to Enhance the Pollutant Degradation Capacity of Shewanella oneidensis. Environmental Science Technology, 54(6), 3599-3608. https://doi.org/http://doi.org/10.1021/acs.est.9b06378

Li, M., Zhang, J., Yang, X., Zhou, Y., Zhang, L., Yang, Y., Luo, L., & Yan, Q. (2021, Apr). Responses of ammonia-oxidizing microorganisms to biochar and compost amendments of heavy metals-polluted soil. Journal of Environmental Science, 102, 263-272. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.jes.2020.09.029

Liem, M., Regensburg-Tuink, T., Henkel, C., Jansen, H., & Spaink, H. (2021, Feb 2). Microbial diversity characterization of seawater in a pilot study using Oxford Nanopore Technologies long-read sequencing. BMC Research Notes, 14(1), 42. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1186/s13104-021-05457-3

Liu, D.-F., & Li, W.-W. (2020). Genome Editing Techniques Promise New Breakthroughs in Water Environmental Microbial Biotechnologies. ACS ES&T Water, 1(4), 745-747. https://doi.org/http://doi.org/10.1021/acsestwater.0c00276

Lott, S. C., Voigt, K., Lambrecht, S. J., Hess, W. R., & Steglich, C. (2020, Aug). A framework for the computational prediction and analysis of non-coding RNAs in microbial environmental populations and their experimental validation. ISME J, 14(8), 1955-1965. https://doi.org/http://doi.org/10.1038/s41396-020-0658-7

Luan, Z., Sun, G., Huang, Y., Yang, Y., Yang, R., Li, C., Wang, T., Tan, D., Qi, S., Jun, C., Wang, C., Wang, S., Zhao, Y., & Jing, Y. (2020). Metagenomics Study Reveals Changes in Gut Microbiota in Centenarians: A Cohort Study of Hainan Centenarians. Frontiers in Microbiology, 11, 1474. https://doi.org/http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01474

Lujan, H., Romer, E., Salisbury, R., Hussain, S., & Sayes, C. (2020, May 1). Determining the Biological Mechanisms of Action for Environmental Exposures: Applying CRISPR/Cas9 to Toxicological Assessments. Toxicology Science, 175(1), 5-18. https://doi.org/http://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa028

Luxem, K. E., Leavitt, W. D., & Zhang, X. (2020). Large Hydrogen Isotope Fractionation Distinguishes Nitrogenase-Derived Methane from Other Methane Sources. Applied and Environment Microbiology, 86(19), e00849-00820. https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.00849-20.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A., & Brock, T. D. (2019). Brock biology of microorganisms. Pearson Education.

Maertens, L., Matroule, J. Y., & Van Houdt, R. (2021, Feb 5). Characteristics of the copper-induced viable-but-non-culturable state in bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 37(3), 37. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s11274-021-03006-5

Meng, F., & Ellis, T. (2020, Oct 14). The second decade of synthetic biology: 2010-2020. Nature Communication, 11(1), 5174. https://doi.org/http://doi.org/10.1038/s41467-020-19092-2

Meyer, B., & Kuever, J. (2007, Oct). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (aprBA) among sulfur-oxidizing prokaryotes. Microbiology (Reading), 153(Pt 10), 3478-3498. https://doi.org/http://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008250-0

Montecillo, J. A. V., Chu, L. L., & Bae, H. (2020). CRISPR-Cas9 System for Plant Genome Editing: Current Approaches and Emerging Developments. Agronomy, 10(7), 1033. https://doi.org/http://doi.org/10.3390/agronomy10071033

Morono, Y., Kubota, K., Tsukagoshi, D., & Terada, T. (2020). EDTA-FISH: A Simple and Effective Approach to Reduce Non-specific Adsorption of Probes in Fluorescence in situ Hybridization (FISH) for Environmental Samples. Microbes Environment, 35(3), ME20062. https://doi.org/http://doi.org/10.1264/jsme2.ME20062

Mukherjee, A., & Reddy, M. S. (2020, Feb). Metatranscriptomics: an approach for retrieving novel eukaryotic genes from polluted and related environments. 3 Biotech, 10(2), 71. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s13205-020-2057-1

Necsulea, A. (2020). Phylogenomics and Genome Annotation (C. Scornavacca, F. d. r. Delsuc, & N. Galtier, Eds.).

Pandey, J., Debnath, A., Tripathi, R. M., Verma, O. P., & Yaduvanshi, N. (2021). DNA Sequencing and Its Types. Biotica Research Today, 3(2), 119-121.

Pineau, S., Sabot, R., Quillet, L., Jeannin, M., Caplat, C., Dupont-Morral, I., & Refait, P. (2008). Formation of the Fe(II–III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase. Corrosion Science, 50(4), 1099-1111. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.corsci.2007.11.029

Rashid, M., & Stingl, U. (2015, Dec). Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology. Biotechnology Advances, 33(8), 1755-1773. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.09.005

Ren, J., Lee, J., & Na, D. (2020, Jan). Recent advances in genetic engineering tools based on synthetic biology. Journal of Microbiology, 58(1), 1-10. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/s12275-020-9334-x

Ribeiro Duarte, A. S., Stark, K. D. C., Munk, P., Leekitcharoenphon, P., Bossers, A., Luiken, R., Sarrazin, S., Lukjancenko, O., Pamp, S. J., Bortolaia, V., Nissen, J. N., Kirstahler, P., Van Gompel, L., Poulsen, C. S., Kaas, R. S., Hellmer, M., Hansen, R. B., Gomez, V. M., & Hald, T. (2020). Addressing Learning Needs on the Use of Metagenomics in Antimicrobial Resistance Surveillance. Frontiers in Public Health, 8, 38. https://doi.org/http://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00038

Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poveda-Cuevas, S. A., Reyes-Guzmán, E. A., Poutou-Piñales, R. A., Reyes-Montaño, E. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Cardozo-Bernal, Á. M. (2015). Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes GlLCC1 from Ganoderma lucidum and POXA 1B from Pleurotus ostreatus in Pichia

pastoris. Plos One, 10(1), e0116524. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002

Rodriguez, C., Jary, A., Hua, C., Woerther, P. L., Bosc, R., Desroches, M., Sitterle, E., Gricourt, G., De Prost, N., Pawlotsky, J. M., Chosidow, O., Sbidian, E., Decousser, J. W., & Multidisciplinary Necrotizing Fasciitis Study, G. (2020, Jul). Pathogen identification by shotgun metagenomics of patients with necrotizing soft-tissue infections. The British Journal of Dermatology, 183(1), 105-113. https://doi.org/http://doi.org/10.1111/bjd.18611

Sanger, S. N., & Coolson, A. R. (1977). DNA Sequencing with chain-terminating Inhibitors. Proceedings of National Academy of Science, USA, 74(12), 54-63.

Santana-Pereira, A. L. R., Sandoval-Powers, M., Monsma, S., Zhou, J., Santos, S. R., Mead, D. A., & Liles, M. R. (2020). Discovery of Novel Biosynthetic Gene Cluster Diversity From a Soil Metagenomic Library. Frontiers in Microbiology, 11, 585398. https://doi.org/http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585398

Shi, H., Zhou, Y., Jia, E., Pan, M., Bai, Y., Ge, Q., & Raju, N. (2021). Bias in RNA-seq Library Preparation: Current Challenges and Solutions. BioMed Research International, 2021, 1-11. https://doi.org/http://doi.org/10.1155/2021/6647597

Su, S., Tian, L., Dong, X., Hickey, P. F., Freytag, S., & Ritchie, M. E. (2020, Apr 1). CellBench: R/Bioconductor software for comparing single-cell RNA-seq analysis methods. Bioinformatics, 36(7), 2288-2290. https://doi.org/http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz889

Torregrosa-Crespo, J., González-Torres, P., Bautista, V., Esclapez, J. M., Pire, C., Camacho, M., Bonete, M. J., Richardson, D. J., Watmough, N. J., & Martínez-Espinosa, R. M. (2017). Analysis of multiple haloarchaeal genomes suggests that the quinone-dependent respiratory nitric oxide reductase is an important source of nitrous oxide in hypersaline environments. Environmental Microbiology Reports, 9(6), 788-796. https://doi.org/ http://doi.org/10.1111/1758-2229.12596

Tyagi, S., Kumar, R., Das, A., Won, S. Y., & Shukla, P. (2020, Aug 10). CRISPR-Cas9 system: A genome-editing tool with endless possibilities. Journal of Biotechnology, 319, 36-53. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.008

Unda-Calvo, J., Martínez-Santos, M., Ruiz-Romera, E., & Lechuga-Crespo, J. L. (2019). Implications of denitrification in the ecological status of an urban river using enzymatic activities in sediments as an indicator. Journal of Environmental Sciences, 75, 255-268. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.jes.2018.03.037

Uyhazi, K. E., & Bennett, J. (2021, Jan 4). A CRISPR view of the 2020 Nobel Prize in Chemistry. Journal of Clinical Investigation, 131(1), e145214. https://doi.org/http://doi.org/10.1172/JCI145214

Van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., & Witholt, B. (2006). Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. Oil & Gas Science and Technology, 58(4), 427-440. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2516/ogst:2003026

Wallenius, A. J., Dalcin Martins, P., Slomp, C. P., & Jetten, M. S. M. (2021). Anthropogenic and Environmental Constraints on the Microbial Methane Cycle in Coastal Sediments. Frontiers in Microbiology, 12, 631621. https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631621

Wang, M., Noor, S., Huan, R., Liu, C., Li, J., Shi, Q., Zhang, Y. J., Wu, C., & He, H. (2020). Comparison of the diversity of cultured and total bacterial communities in marine sediment using culture-dependent and sequencing methods. PeerJ, 8, e10060. https://doi.org/http://doi.org/10.7717/peerj.10060

Weis, C. V., Jutzeler, C. R., & Borgwardt, K. (2020, Oct). Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. Clinical and Microbiology Infections, 26(10), 1310-1317. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.03.014

Wideman, N. E., Oliver, J. D., Crandall, P. G., & Jarvis, N. A. (2021, Jan 19). Detection and Potential Virulence of Viable but Non-

Culturable (VBNC) Listeria monocytogenes: A Review. Microorganisms, 9(1), 194. https://doi.org/http://doi.org/10.3390/microorganisms9010194

Wise, B. R., Roane, T. M., & Mosier, A. C. (2020). Community Composition of Nitrite Reductase Gene Sequences in an Acid Mine Drainage Environment. Microbial Ecology, 79, 562-575. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s00248-019-01420-9

Yan, Q., & Fong, S. S. (2017). Challenges and Advances for Genetic Engineering of Non-model Bacteria and Uses in Consolidated Bioprocessing. Frontiers in Microbiology, 8, 2060. https://doi.org/http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02060

Yang, S., Corbett, S. E., Koga, Y., Wang, Z., Johnson, W. E., Yajima, M., & Campbell, J. D. (2020, Mar 5). Decontamination of ambient RNA in single-cell RNA-seq with DecontX. Genome Biology, 21(1), 57. https://doi.org/http://doi.org/10.1186/s13059-020-1950-6

Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S., & Huang, Y. (2014, Nov). Distribution of naphthalene dioxygenase genes in crude oil-contaminated soils. Microbial Ecology, 68(4), 785-793. https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s00248-014-0457-7

Zhang, S., Shen, J., Li, D., & Cheng, Y. (2021). Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. Theranostics, 11(2), 614-648. https://doi.org/http://doi.org/10.7150/thno.47007

Zhao, J., Fang, H., & Zhang, D. (2020, Dec). Expanding application of CRISPR-Cas9 system in microorganisms. Synth Syst Biotechnol, 5(4), 269-276. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.08.001

Zhao, Y., Wei, L., Tagmount, A., Loguinov, A., Sobh, A., Hubbard, A., McHale, C. M., Chang, C. J., Vulpe, C. D., & Zhang, L. (2021, Apr). Applying genome-wide CRISPR to identify known and novel genes and pathways that modulate formaldehyde toxicity. Chemosphere, 269, 128701. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128701



Capítulo 14

ANEXOS



Capítulo 14

Anexos

Anexos A
Preparación de medios de cultivo

1. Agar PDA: Por componentes: Infusión papa (200 g de papa) (4 g/L), Glucosa (2 g/L), Agar (20 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (5,5). Por casa comercial: Base 39,9 g/L agua destilada (1000 mL) y pH final (5,5).

Preparación: Pesar cada uno de los componentes o el producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 1000 mL de agua destilada y calentar lentamente en plancha de calentamiento, homogenizar o mezclar regularmente hasta que comience a hervir. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 18 psi por 15 minutos. Si el agar se elabora por componentes adicionar cada uno de ellos a excepción del agar. Adicionar el agua al recipiente de vidrio, homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 5,5 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Posteriormente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento repitiendo la operación como si fuera el producto comercial.

2. Agar nutritivo: Peptona de carne (5 g/L), extracto de carne (30 g/L), agar-agar (20 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar cada uno de los componentes y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 1000 mL de agua destilada y calentar lentamente en plancha de calentamiento, homogenizar regularmente hasta que se observe la completa disolución y comience a hervir. Esterilizar en autoclave

a 116,9 °C, 15 psi por 15 minutos. Si el agar se elabora por componentes adicionar cada uno de ellos a excepción del agar. Adicionar el agua al recipiente de vidrio, homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Posteriormente, adicionar el agar y calentar lentamente en mechero repitiendo la operación como si fuera el producto comercial.

3. Agar avena al 5 % (m/v) con nistatina al 0,01 % (m/v): Por componentes: Avena en polvo (50 g/L), agar (20 g/L), nistatina (0,1 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,2). Casa comercial: Medio base (72,5 g/L), nistatina (0,1 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar cada uno de los componentes o el producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 1000 mL de agua destilada y calentar lentamente en plancha de calentamiento, homogenizar regularmente hasta que comience a hervir. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Si el agar se elabora por componentes adicionar cada uno de ellos a excepción del agar y el agua al recipiente de vidrio, homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Posteriormente, adicionar el agar y calentar lentamente en mechero repitiendo la operación como si fuera el producto comercial.

4. Agar leche: Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (0,1 g/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (0,1 g/L), cloruro de calcio ($CaCl_2$), (0,5 g/L), peptona universal (2,5 g/L), extracto de levadura (2,5 g/L), leche hi calcium (10 g/L), agua destilada 1000 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente, adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 7 minutos a 7,5 psi de presión por 121°C.

5. Agar tributirina: Por componentes: Peptona universal (5,5 g/L), extracto de levadura (3,5 g/L), agar-agar (15 g/L), 10 mL de glicerol al 99,5% (v/v), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,0). Por casa comercial: Pesar los gramos que indique la casa comercial, agua destilada (1000 mL), 10 mL de glicerol al 99,5% (v/v) y pH final (5,5).

Preparación: Pesar cada uno de los componentes y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 990 mL de agua destilada y calentar lentamente en plancha de calentamiento, homogenizar regularmente hasta que se observe la completa disolución y comience a hervir. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Si el agar se elabora por componentes adicionar cada uno de ellos a excepción del agar y el agua al recipiente de vidrio, homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Posteriormente, adicionar el agar y calentar lentamente en mechero repitiendo la operación como si fuera el producto comercial.

6. Agar almidón: Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (0,1 g/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (0,1 g/L), cloruro de calcio ($CaCl_2$), (0,5 g/L), peptona universal (2,5 g/L), extracto de levadura (2,5 g/L), maizena (10 g/L), agua destilada 1000 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente, adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 7 minutos a 7,5 psi de presión por 121° C.

7. Agar pectina: Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (0,1 g/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (0,1 g/L), cloruro de calcio ($CaCl_2$), (0,5 g/L), peptona universal (2,5 g/L), extracto de levadura (2,5 g/L), pectina alimentaria (10 g/L), agua destilada 1000 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente, adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 7 minutos a 7,5 psi de presión por 121°C.

8. Agar celulosa: Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (0,1 g/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (0,1 g/L), cloruro de calcio ($CaCl_2$), (0,5 g/L), peptona universal (2,5 g/L), extracto de levadura (2,5 g/L), celulosa de baja densidad (10 g/L), agua destilada 1000 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente, adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 7 minutos a 7,5 psi de presión por 121°C.

9. Agar salvado de trigo con 2,2´-Azino-bis (3-ethylbenzotiasolina-6-ácido sulfónico (ABTS): Salvado de trigo (175 g/L), glucosa (10 g/L), extracto de levadura (2 g/L), peptona (5 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05 g/L), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,076 g/L), K_2HPO_4 (0,1 g/L), cloranfenicol (0,1 g/L), agar (20 g/L), agua destilada (1000 mL), pH final (6,5) y ABTS 0,5 mM (adicionar 277,3 mg de ABTS para un litro de medio).

Preparación: Para preparar el extracto líquido de salvado de trigo se debe pesar 175 g de salvado y adicionar a un recipiente que contenga un 1 litro de agua. Mezclar y dejar reposar por 1 hora. Posteriormente filtrar empleando un colador y recuperar el líquido o también llamado extracto de salvado. Medir el volumen de extracto y adicionar agua destilada hasta completar un litro. Adicionar los demás compoenten del medio a esta solución y ajustar a pH de 6,5. Agregar 20 g de agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 psi de presión por 121° C. El ABTS se adiciona después de esterilizar. Para preparar caldo salvado de trigo, se utilizan los mismos componentes, pero no se adiciona agar.

10. Agar salvado con MnCl2: Salvado de trigo (175 g/L), glucosa (10 g/L), extracto de levadura (2 g/L), peptona (5 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05 g/L), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,076 g/L), K_2HPO_4 (0,1 g/L), cloranfenicol (0,1 g/L), agar (20 g/L), agua destilada (1000 mL), pH final (6,5) y $MnCl_2$ 0,5 mM. Adicionar 62,9 mg de $MnCl_2$ para un litro de medio.

Preparación: Para preparar el extracto líquido de salvado de trigo se debe pesar 175 g de salvado y adiconar a un recipiente que contenga un 1 litro de agua. Mezclar y dejar reposar por 1 hora. Posteriormente filtrar empleando un colador y recuperar el líquido o también llamado extracto de salvado. Medir el volumen de extracto y se adicionar agua destilada hasta completar un litro. Adicionar los demás compoenten del medio a esta solución y ajustar a pH de 6,5. Agregar 20 g de agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 psi de presión por 121° C. El $MnCl_2$ 0,5 mM.se adiciona después de esterilizar. Para preparar caldo salvado de trigo, se utilizan los mismos componentes, pero no se adiciona agar.

11. Agar lignina I: Extracto líquido de aserrín (100 mL), agar- agar (20 g/L), agua destilada (900 mL) y pH final (6,5).

Preparación: Para la obtención de extracto líquido de aserrín, pesar 300 g de aserrín y adicionar 1000 mL de NaOH 2 N. Autocalvar por 1 hora a 115°C y 15 psi (extracción térmica y química de la lignina soluble). Enfriar y filtrar en embudo plástico el extracto líquido concentrado. Diluir el extracto concentrado 1/10 con agua destilada y ajustar el pH a 6,5 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 psi de presión por 121°C.

12. Agar lignina II: Extracto líquido de aserrín (100 mL), agar- agar (20 g/L), glucosa (10 g/L), agua destilada (900 mL) y pH final (6,5).

Preparación: Para la obtención de extracto líquido de aserrín, pesar 300 g de aserrín y adicionar 1000 mL de NaOH 2 N. Autocalvar por 1 hora a 115°C y 15 psi (extracción térmica y química de la lignina soluble). Enfriar y filtrar en embudo plástico el extracto líquido concentrado. Diluir el extracto concentrado 1/10 con agua destilada y ajustar el pH a 6,5 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Adicionar el agar, la glucosa y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 psi de presión por 121°C.

13. Agar lignina III: Extracto líquido de aserrín (100 mL), agar- agar (20 g/L), glucosa (10 g/L), slfato de manganeso ($MnSO_4$), (100 mg/L), sulfato de cobre ($CuSO_4$), (100 mg/L), agua destilada (900 mL) y pH final (6,5).

Preparación: Para la obtención de extracto líquido de aserrín, pesar 300 g de aserrín y adicionar 1000 mL de NaOH 2 N. Autocalvar por 1 hora a 115°C y 15 psi (extracción térmica y química de la lignina soluble). Enfriar y filtrar en embudo plástico el extracto líquido concentrado. Diluir el extracto concentrado 1/10 con agua destilada y ajustar el pH a 6,5 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Adicionar el agar, la glucosa, el sulfato de manganeso, sulfato de cobre y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 psi de presión por 121°C.

14. Agar agua suplementado con glucosa y extracto de levadura: Glucosa (1,0 g/L), extracto de levadura (0,1 g/L), agua destilada (1000 mL), agar agar (20 g/L) y pH final 6,5

Preparación: Pesar cada uno de los componentes, depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

15. Medio líquido mineral más inductores para producción de biosurfactante: Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4), (2,2 g/L), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (1,4 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4*7H_2O$), (0,6 g/L), sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4*7H_2O$), (0,01 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (0,05 g/L), cloruro de calcio ($CaCl_2$), (0,02 g/L), extracto de levadura (0,02 g/L), nitrato de amonio (NH_4NO_3), (1 g/L), glicerol (2 % v/v), solución de elementos traza (1 mL). pH final (7,2).

Solución de micronutrientes: Sulfato de Zinc ($ZnSO_4$), (2,32 g/L), sulfato de manganeso tetrahidratado ($MnSO_4*4H_2O$), (1,78 g/L), ácido bórico (H_3BO_3), (0,56 g/L), sulfito de cobre tetrahidratado ($CuSO_3*4H_2O$), (1 g/L), permanganato de sodio dihidratado ($NaMnO_4*2H_2O$), (0,3 g/L), cloruro de calcio hexahidratado ($CaCl_2*6H_2O$), (0,42 g/L), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), (1 g), cloruro de níquel hexahidratado ($NiCl_2*6H_2O$), (0,004 g/L), yoduro de potasio (KI), (0,66 g/L), agua destilada (1000 mL).

Preparación: Pesar o medir cada componente y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 999 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

16. Agar Siegmund and Wagner (SW): Nitrato de sodio (Na_2NO_3), (1 g/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (0,1 g/L), sulfato de magnesio heptrahidratado ($MgSO_4*7H_2O$), (0,1 g/L), cloruro de calcio ($CaCl_2$), (0,1 g/L), glicerol (2% v/v), azul metileno (0,005 g/L), extracto levadura (0,2 g/L), bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), (0,2 g/L), agar (20 g/L), agua (1000 mL) y pH final (6,5).

Preparación: Pesar o medir cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 980 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 6,5 con NaOH 1N o HCl 1N. Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

17. Agar King B: Por componentes: Peptona proteosa (20 g/L), sulfato de magnesio monohidratado ($MgSO_4 \cdot H_2O$), (1,5 g/L), fosfato dibásico de potasio dihidratado

($K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), (1,8 g/L), glicerol (10 mL/L) y agua destilada (990 mL/L) y pH final (7,2). Casa comercial: medio basal (33,3 g/L), glicerol (10 mL/L), agua destilada (990 mL/L) y pH final (7,2).

Preparación: Pesar cada uno de los componentes o el producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 990 mL de agua destilada y calentar lentamente en plancha de calentamiento, homogenizando regularmente hasta que comience a hervir. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Si el agar se elabora por componentes adicionar cada uno de ellos a excepción del agar y el agua al recipiente de vidrio, homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Posteriormente, adicionar el agar y calentar lentamente en mechero repitiendo la operación como si fuera el producto comercial.

18. Agar Rhada: Fosfato monobásico de postasio (KH_2PO_4), (2 g/L), cloruro de amonio (NH_4Cl), (0,05 g/L), sulfato de magnesio monohidratado ($MgSO_4$ H_2O), (0,5 g/L), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$ $2H_2O$), (0,1 g/L), agar agar (7 g/L), 0,1 mL de solución de elementos traza y pH final 6,5.

Solución de elementos traza: sulfato de manganeso ($MnSO_4$), (0,5 g/L), sulfato de hierro heptahidratdo ($FeSO_4$ $7H_2O$), (0,1 g/L) y sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4$ $7H_2O$), (0,1 g/L).

Preparación: Pesar cada uno de los componentes o el producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 999,9 mL de agua destilada y calentar lentamente en plancha de calentamiento, homogenizando regularmente hasta que comience a hervir. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Si el agar se elabora por componentes adicionar cada uno de ellos a excepción del agar y el agua al recipiente de vidrio, homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44).

19. Agar YMA: Manitol (10 g/L), extracto de levadura (0,8 g/L), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (0,2 g/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (0,1 g/L), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), (0,1 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), (0,2 g/L), clorudo de sodio (NaCl), (0,1 g/L), agar (20 g/L), 7 mL de rojo congo 0, % (m/v), agua destilada (993 mL) y pH final (7,2).

Preparación: Pesar o medir en volumen cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 993 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

20. Agar Ashby: Manitol (20 g/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (1 g/L), sulfato de magnesio heptrahidratado ($MgSO_4$*$7H_2O$), (0,2 g/L), sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4$*$7H_2O$), (0,0005 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (0,2 g/L), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$*$2H_2O$), (0,2 g/L), agar (20 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

21. Agar NFB. Agar semisólido para el aislamiento de diazotrófos microaerofílicos: Acido D-málico (5 g/L), solución al 10 % (m/v) de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (5 mL), solución al 10 % (m/v) de sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (2 mL), solución al 10% (m/v) de cloruro de sodio (NaCl), (1 mL), solución al 1% (m/v) de cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$ *$2H_2O$) (2 mL), solución al 0,5% (m/v) de azul de bromotimol en 0,2 N, de hidróxido de potasio (KOH), (2 mL), solución de micronutrientes (semisólido) (2 mL), solución al 1,64% (m/v) de EDTA preparado en agua

ajustar pH 7,2 para disolverlo completamente (4 mL), hidróxido de potasio (KOH), (4,5 g/L), solución de vitaminas (1 mL), pH (6,8) y agar agar (10 g/L). Para el medio sólido se pesan 20 g/L de agar.

Solución de micronutrientes para NFB: Molibdato de sodio dihidratado (Na_2MoO_4*$2H_2O$), (0,2 g/ 200 mL), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (0,235 g/ 200 mL), ácido bórico (H_3BO_3), (0,280 g/ 200 mL), sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), (0,008 g/ 200 mL), sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), (0,024 g/200 mL) y agua destilada (200 mL).

Solución de vitaminas para NFB: Biotina 10 mg/100 mL, Piridoxina HCl 20 mg/100 m y H2O destilada. 100 mL.

Preparación: Pesar o medir en volumen cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente, adicionar 982 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 6,8 con KOH 1N o ácido málico (anexo B, numeral 8 y 9). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Para preparar agar NFB se adicionan los mismos componentes y se incremente la concentración de agar a 20 g por cada 1000 mL de medio.

22. Agar LGI: Sacarosa (5 g/L), solución al 10% (m/v) de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (2 mL), solución al 10 % (m/v) de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (6 mL), solución al 10% (m/v) de sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (2 mL), solución al 1 % (m/v) de cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$ *H_2O),(2 mL), solución al 0,1% (m/v) de molibdato de sodio dihidratado ($NaMoO_4.2H_2O$), (2 mL), solución al 0,5 % (m/v) de azul de bromotimol en 0,2 N KOH (5 mL), solución al 1% (m/v) de cloruro de hierro hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$), (1 mL), pH (6,2) y agar agar (1,8 g/L). Para el medio sólido se pesan 20 g/L de agar.

Preparación: Pesar o medir en volumen cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente, adicionar el agua destilada para completar 1000 mL, homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 6,8 con KOH 1N o ácido málico (anexo B, numeral 8 y 9). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Para preparar agar NFB se adicionan los mismos componentes y se incremente la concentración de agar a 20 g por cada 1000 mL de medio.

23. Agar Rojo Congo: Acido D-málico (5 g/L), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (0,5 g/L), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (0,2 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (0,1 g/L), cloruro de hierro hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$), (0,015 g/L), hidróxido de potasio (KOH), (4.8 g/L), agar agar (15 g/L), extracto de levadura (1 g/L), solución 1:400 Rojo Congo (15 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar o medir en volumen cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente, adicionar 985 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 6,8 con KOH 1N o ácido málico (anexo B, numeral 8 y 9). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

24. Caldo amonio: Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), (500 mg/L), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), (40 mg/L), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), (40 mg/L), fosfato monobásico de potasio ($KH2PO_4$), (200 mg/L), carbonato de calcio ($CaCO_3$), (2 mg/L) y pH final (7,0).

Preparación: Mezclar los componentes, calentar hasta ebullición con agitación constante y autoclavar a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. El agar amonio se prepara con los mismos componentes y se adicionan 20 g/L de agar.

25. Caldo nitrato: Nitrato de potasio (KNO_3), (500 mg/L), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (18 mg/L), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$*$2H_2O$), (12,5 mg/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (500 mg/L), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (500

mg/L), sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4*7H_2O$), (10 mg/L), carbonato de calcio ($CaCO_3$), (1500 mg/L) y pH final (7,0).

Preparación: Mezclar los componentes, calentar hasta ebullición con agitación constante y autoclavar a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. El agar nitrato se prepara con los mismos componentes y se adicionan 20 g/L de agar.

26. Caldo SRMS1 sin indicador de pH: Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), (0,5 g/L), cloruro de potasio (KCl), (0,2 g/L), sulfato de magnesio monihidratado ($MgSO_4*H_2O$), (0,3 g/L), sulfato de manganeso monihidratado ($MnSO_4*H_2O$), (0,004 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (0,2 g/L), sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4*7H_2O$), (0,0004 g/L), glucosa (10 g/L), extracto de levadura (0,1 g/L), fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$), (5 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,2).

Preparación: Pesar cada componente y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 447). Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. El fosfato tricálcico se esteriliza en seco por aparte para adicionarlo al medio una vez esté estéril.

27. Agar SRMS1 con indicador de pH: por componentes: Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), (0,5 g/L), cloruro de potasio (KCl), (0,2 g/L), sulfato de magnesio monihidratado ($MgSO_4*H_2O$), (0,3 g/L), sulfato de manganeso monihidratado ($MnSO_4*H_2O$), (0,004 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (0,2 g/L), sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4*7H_2O$), (0,0004 g/L), glucosa (10 g/L), extracto de levadura (0,1 g/L), fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$), (5 g/L), púrpura de bromocresol (0,1 g/L), agar (20 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,2).

Preparación: Pesar cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (Anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave a 116,9 °C, 15 psi por 15 minutos. El fosfato tricálcico se esteriliza en seco por aparte para adicionarlo al medio una vez esté estéril.

28. Agar Picovskaya: Por componentes: Glucosa (10 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (0,2 g/L), sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), (0,5 g/L), sulfato de magnesio monohidratado ($MgSO_4*H_2O$), (0,1 g/L), sulfato de manganeso monohidratado ($MnSO_4*H_2O$), (0,1 g/L), extracto de levadura (0,5 g/L), fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$), (5 g/L), agar (20 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,2).

Preparación: Pesar cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,2 con NaOH 1N o HCl 1N (Anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 psi por 121° C. El fosfato tricálcico se esteriliza en seco por aparte para adicionarlo al medio una vez esté estéril.

29. Caldo API: ***Por componentes:*** Lactato de sodio ($NaC_3H_5O_3$), (4 g/L), extracto de levadura (1 g/L), ácido ascórbico o vitamina C (0,1 g/L), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (0,2 g/L), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (0,01 g/L), sulfato ferroso de amonio ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2*_6H_2O$), (0,2 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (10 g/L), resazurina de sodio (0,001 g/L), agua destilada (1000 mL) y pH final (7,0).

Preparación: Pesar o medir cada componente a excepción del agar y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 6,5 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Finalmente, adicionar el agar y calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave. Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

30. Caldo para Thiobacillus acidófilos: por componentes: Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (0,5 g/700 mL), carbonato de calcio ($CaCO_3$), (2 g/700 mL), sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), (2 g/700 mL), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4$*7 H_2O), (0,2 g/700 mL), sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4$ * 7 H_2O) al 14% (300 mL), ácido sulfúrico (H_2SO_4),10 N (1 mL), nitrato de calcio $Ca(NO_3)_2$, (0,01 g/700 mL), cloruro de potasio (KCl), (0,1 g/700 mL), elementos traza (1 mL) y agua destilada (700 mL).

Solución de elementos traza: EDTA (50 g/L), Sulfato de zinc ($ZnSO_4$), (2,2 g/L), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$ **2H_2O), (5,5 g/L), cloruro de manganeso tetrahidratado (Mn_2Cl *4H_2O), (5,06 g/L), ortomolibdato de amonio tetrahidratado ($(NH4)_2MoO_4$ * 4 H_2O), (1,1 g/L), sulfato de cobre heptahidratado ($CuSO_4$ * 5H_2O), (1,57 g/L) y cloruro de calcio hezhidratado ($CaCl_2$ * 6 H_2O), (1,61 g/L).

Preparación: Pesar o medir cada componente a excepción del $FeSO_4$ y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 700 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 2,0 con H_2SO_4 10 N (anexo B, numeral 16). Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Autoclavar el $FeSO_4$ en seco a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos, adicionar agua estéril hasta el volumen requerido (300 mL) para que tenga una concentración final en el medio del 14% (v/v). Mezclar el medio con la solución de $FeSO_4$

31. Caldo para Thiobacillus neutrófilos por componentes: fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (3 g/L), carbonato de calcio ($CaCO_3$), (2 g/L), sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), (0,3 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4$* 7 H_2O), (0,3 g/L), cloruro de hierro hexahidratado ($FeCl_3$ * 6 H_2O), (0,02 g/L), tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$), (10 g/L), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$ * 2 H_2O), (0,2 g/L), elementos traza (1 mL) y agua destilada (1000 mL).

Solución de elementos traza: EDTA (50 g/L), Sulfato de zinc ($ZnSO_4$), (2,2 g/L), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$ **2 H_2O), (5,5 g/L), cloruro de manganeso tetrahidratado (Mn_2Cl * 4H_2O), (5,06 g/L), ortomolibdato de amonio tetrahidratado ($(NH_4)_2MoO_4$ * 4 H_2O), (1,1 g/L), sulfato de cobre heptahidratado ($CuSO_4$ * 7H_2O), (1,57 g/L) y cloruro de calcio hexahidratado ($CaCl_2$ * 6 H_2O), (1,61 g/L).

Preparación: Pesar o medir cada componente y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

32. Caldo nutritivo: Pesar 8 gramos del producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 1000 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

33. Medio mínimo mineral Bold suplementado con 1 g/L de glucosa: Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2$*H_2O), (25 mg/L), cloruro de sodio (NaCl), (25 mg/L), nitrato de sodio ($NaNO_3$), (250 mg/ L), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (75 mg/ L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (105 mg/L), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (75 mg/L), glucosa (a g/L). Adicionalmente, se añaden 3 mg/L de solución de elementos traza. El pH final del medio es 7,0.

Solución de elementos traza: cloruo de hierro ($FeCl_3$), (0,194 g/L), cloruo de manganeso ($MnCl_2$), (0,082 g/L), cloruro de cobalto ($CoCl_2$), (0,16 g/L), molibdato de sodio dihidratado ($Na_2MoO_4H_2O$), (0,008 g/L), cloriro de zinc ($ZnCl_2$), (0,005 g/L) y pH (7.0).

Preparación: Pesar o medir cada componente y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 997 mL de agua destilada homogenizar y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Para preparar el agar Bold se adicionar 20 g/L de agar agar después de ajustar el pH, calentar lentamente en plancha de calentamiento hasta ebullición suave y esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

34. Agar Rosa de Bengala: ***Por componentes:*** Glucosa (10 g/L), peptona bacteriológica (5 g/L), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), (1 g/L), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (0,5 g/L), cloranfenicol (0,1 g/L), colorante rosa de bengala (0,05 g/L), agar (20 g/L) y pH 5,5. ***Por casa comercial:*** Pesar 31, 6 g del producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Posteriormente adicionar 1000 mL de agua destilada, disolver en plancha de calentamiento hasta ebullición suve y medir el pH con potenciómetro ajustando a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N (anexo B, numeral 43 y 44). Esterilizar en autoclave a 116,9°C, 15 psi por 15 minutos.

35. Composición del medio Caldo A-1: Lactosa (5,0 g/L), triptona (20 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (5,0 g/L), Salicina (0,5 g/L), Triton X-100 (Polyethylene glycol p-isooctylphenyl ether (1,0 mL), agua destilada 1 L.

Preparación: Suspender 31,5 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Dispensar en tubos con campanas Durham para la detección de gas, y esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos. ***Nota:*** para 10 mL de muestra de agua, preparar el medio con doble concentración.

36. Composición del Colilert®- 18 (sustrato definido): o-nitrofeil-β-D-galactopiranósido (ONPG) (50 mg/100 mL), MUG (7,5 mg/100 mL), KH2PO4 (620 mg/100 mL), Anfoterecina (0,1 mg/100 mL), Solanium (50 mg/100 mL), sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), (500 mg / 100 mL), sulfato de manganeso ($MnSO_4$), (5 mg /100 mL), sulfato de zinc ($ZnSO_4$), (5 mg /100 mL), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), (10 mg /100 mL), cloruro de calcio ($CaCl_2$), (5 mg /100 mL), fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4), (90 mg /100 mL), sulfito de sodio (Na_2SO_3), (4 mg / 100 mL), cloruro de sodio (NaCl), (1000 mg / 100 mL). Este medio de cultivo viene pre-dispensado en viales (o "sachet") estéril y listo para utilizar. NO requiere autoclavado ni preparación.

37. Agar Scholtens Modificado (MSA): Agar para cuantificación de fagos somáticos, corresponde a la primera capa de agar la que se sirve en la caja y se deja solidificar previamente a la prueba. Por componentes: peptona (10 g/L), extracto de levadura (3 g/L), extracto de carne (12 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (3 g/L), solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3), (150 g/L) (5 mL), Solución de cloruo de magnesio (100 g de $MgCl_2.6H_2O$ en 50 mL de H_2O (0,3 mL), Solución de cloruro de calcio ($CaCl_2$)1 mol/L. Ver la forma de preparación abajo y este reactivo se adiciona después de autoclavar a una temperatura de 45°C. (6 mL), agar agar (16 g) y agua destilada (1000 mL).

Medio completo: Son los mismos componentes y cantidades del caldo MSB solo que se debe adicionar agar-agar en una proporción de 16 g/L de medio preparado, autoclavar el medio completo y finalmente dejar enfriar hasta +/- 45°C para agregar asépticamente una solución de cloruro de calcio estéril (1 mol/L) en una proporción de 0,6 mL por cada 100 mL (6 mL para un litro) de medio preparado. Mezclar bien y servir en cajas de Petri, así: Dejar solidificar y almacenar en oscuridad a 5 +/- 3°C inferior a 1 mes, si hay buena protección contra la desecación. Solución de cloruro de calcio 1 M (anexo B, numeral 38).

Para la preparación del caldo MSB se debe tener precaución de no adicionar la solución de $CaCl_2$ porque puede precipitarse e interferir en la lectura por densidad óptica del inoculo, y por consiguiente en los resultados de la práctica. Por otro lado, las soluciones de Na_2CO_3 y Mg, se deben autoclavar por separado y adicionar posteriormente al resto de componentes en los medios correspondientes.

38. Agar Semisólido Scholtens Modificado (MSAss): Agar semisólido para determinación de fagos somáticos, corresponde a la segunda capa de agar. Por componentes: peptona (10 g/L), extracto de levadura (3 g/L), extracto de carne (12 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (3 g/L), solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3), (150 g/L) (5 mL), solución de Mg (100 g de $MgCl_2.6H_2O$ en 50 mL de H_2O) (0,3 mL).

Medio completo: Son los mismos componentes y cantidades del caldo MSB solo que se debe adicionar agar-agar en una proporción de 16 g/L de medio preparado, autoclavar el medio completo y finalmente dejar enfriar hasta +/- 45°C para agregar asépticamente una solución de cloruro de calcio estéril (1 mol/L) en una proporción

de 0,6 mL por cada 100 mL (6 mL para un litro) de medio preparado. Mezclar bien y servir en cajas de Petri, así: Dejar solidificar y almacenar en oscuridad a 5 +/- 3°C inferior a 1 mes, si hay buena protección contra la desecación. Solución de cloruro de calcio 1 M (anexo B, numeral 38).

Disuelva el cloruro de calcio en agua mientras se calienta suavemente, enfríe a temperatura ambiente y esterilice por filtración a través de una membrana con poros de 0,2 µm, almacene en oscuridad a 5 +/- 3°C por no más de 6 meses. Solución de ácido nalidíxico (anexo B, numeral 37).

39. Caldo Scholtens Modificado (MSB): Caldo para cultivo de la cepa huésped de fagos somáticos.

Por componentes: peptona (10 g/L), Extracto de levadura (3 g/L), extracto de carne (12 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (3 g/L), Solución de Na_2CO_3 (150 g/L) (5 mL), Solución de $MgCl_2.6H_2O$ (100 g de $MgCl_2.6H_2O$ en 50 mL de H_2O), (0,3 mL), Agua destilada (1000 mL), disuelva los ingredientes en agua caliente. Ajuste el pH a 7,2 +/- 0,2 a 45 +/- 3°C, así después de esterilizar, éste será de 7,2 +/- 0,5, distribuya el medio en botellas en volúmenes de 100 mL. esterilice en autoclave a 121 +/- 1°C por 15 min, almacene en oscuridad a 5 +/- 3°C por no más de 6 meses.

Preparación de la solución de $MgCl_2$:
El $MgCl_2.6H_2O$ es muy higroscópico y no debe ser almacenado en forma cristalina una vez que el contenedor ha sido abierto, por eso, use el contenido total de un contenedor y disolver en la cantidad de agua apropiada, añadir 100 g de $MgCl_2.6H_2O$ en 50 mL de agua destilada, la concentración final de Mg^{2+} en esta solución será de 4,14 mol/L, esterilizar en autoclave y almacene a temperatura ambiente en oscuridad.

Preparación de la solución de Na_2CO_3:
El Na_2CO_3 corrosivo por tanto debe manipularse con guantes, gafas y batas apropiados, añadir 15 g a 100 mL de agua destilada, esterilizare en autoclave y almacenar a temperatura ambiente en oscuridad.

40. Caldo tripticasa de soya: Digerido pancreático de caseína (14,5 g/L), digerido papáico de soya (5,0 g/L), cloruro de sodio (5,0 g/L), factores de crecimiento (1,5 g/L) y agar (14, 5 g/L).

Preparación: Suspender cada uno de los componentes en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo en plancha de calentamiento. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C.

41. Medio Rappaport semosólido: Triptosa (4,59 g/L), hidrolizado de caseína (ácido) (4,59 g/L), cloruro de sodio (NaCl), (7,34 g/L), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), (1,47 g/L), Cloruro de magnesio, anhidro ($MgCl_2$) (10,93 g/L), oxalato de verde de malaquita 0,037 g (37 mg/L), agar (2,7 g/L), agua de grado reactivo (1000 mL) y solución de novobiocina (2%).

Preparacion: Después de mezclar bien los componentes, calentar hasta que hierva para disolverlos completamente (no esterilizar en autoclave). Dejar enfriar a 50°C aproximadamente y agregar la solución de novobiocina al 2% por litro de medio. Mezclar bien girando el medio. Inmediatamente vertir en cajas de Petri. No invierta las placas para almacenar. Nota: Si usa un suplemento antimicrobiano de novobiocina preparado comercialmente, agregue un volumen suficiente para lograr una concentración de 0,002% por litro.

42. Agar X. L. D. (Xilosa, lisina, desoxicolato): Xilosa (3,75 g/L), Lisina (5,0 g/L), Lactosa (7,5 g/L), Sacarosa (7,5 g/L), Cloruro de sodio (NaCl), (5,0 g/L), extracto de levadura (3,0 g/L), Rojo Fenol (0,08 g/L), Desoxicolato de Sodio (2,5 g/L), Tiosulfato de Sodio ($Na_2S_2O_2$), (6,8 g/L), Citrato Férrico de Amonio (0,8 g/L), Agar (15,0 g/L), Agua destilada c.s.p. (1000 mL), pH final 7.4 +/0.2.

Preparación: Suspender 57 g de medio en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente. Calentar con agitación suave hasta que el medio llegue a ebullición. Evitar el sobrecalentamiento ya que puede provocar la precipitación del medio. Este medio NO se puede esterilizar por autoclave.

43. Agar TSI (triple azúcar-hierro). Digerido pancreático de caseína (10,0 g/L), Digerido péptico de tejido animal (10,0 g/L), Cloruro sódico (5,0 g/L), Lactosa (10,0 g/L), sacarosa (10,0 g/L), Dextrosa (1,0 g/L), Sulfato ferroso de amonio (0,2 g/L), Tiosulfato sódico (0,2 g/L), Rojo fenol (0,025 g/L), Agar (13,0 g/L) pH: (7,3 +7- 0,2).

Preparacion: Pese 62,5 g del medio agar hierro triple azúcar (TSI) deshidratado y disuelva en un litro de agua destilada. Caliente hasta disolver completamente el agar. Hervir por un minuto agitando frecuentemente. Distribuir 4 mL del medio en tubos de ensayo 13/100. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Sacar de la autoclave y dejar reposar de forma inclinada. Se debe cuidar que tanto la base como el bisel tengan la misma distancia. Almacenar en nevera 2-8°C. Dejar atemperar antes de sembrar la cepa bacteriana.

44. Agar LIA (agar lisina-hierro): Agar bacteriológico (13,5 g/L), púrpura de bromocresol (0,02 g/L), glucosa p(1 g/L), citrato de amonio férrico (0,5 g/L), eptona de gelatina (5 g/L), L-Lisina (10 g/L), tiosulfato de sodio (0,04 g/L), extracto de levadura (3 g/L), pH: (6,7 +/- 0,2).

Preparacion: Suspender 33 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Dispensar en tubos y esterilizar en autoclave a 121° C durante 12 minutos. Dejar enfriar en posición inclinada.

45. Agar BHI (infusión cerebro corazón): Glucosa (2 g/L), Fosfato dibásico de sodio (2,5 g/L), peptona de gelatina (10 g/L), cloruro sódico (5 g/L), infusión de corazón (10 g/L), infusión de cerebro (7,5 g/L), pH (7,3 +7- 0,2).

Preparación: Suspender 37 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Dispensar en recipientes apropiados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. El medio preparado debe almacenarse a 2-8°C. Para obtener mejores resultados el medio debe usarse el mismo día, de no ser así, debe calentarse en agua hirviendo para expulsar el oxígeno disuelto y dejar enfriar antes de usar.

46. Caldo Lauril sulfato: Triptosa (20 g/L), lactosa (5,0 g/L), cloruro de sodio (5,0 g/L), fosfato dibásico de potasio (2,75 g/L), fosfato monobásico de potasico (2,75 g/L), luril sulfato sódico (0,10 g/L) y pH 6,8.

Preparación: Disolver 35,7 g en un litro de agua destilasa. Autoclavar a 121° C durante 15 minutos.

47. Caldo EC: Triptosa (20 g/L), lactosa (5,0 g/L), fofato monobásico de potasio (5,5 g/L), cloruro de sodio (5,0 g/L), sales biliares (1,5 g/L) y pH 6,9.

Preparación: Disolver 35,7 g en un litro de agua destilasa. Autoclavar a 121° C durante 15 minutos

ANEXO B
Preparación de reactivos

1. Solución salina al 0,85 % (m/v): Pesar 0,85 g de cloruro de sodio (NaCl) y disolver en 100 mL de agua destilada. Depositar en un frasco de vidrio previamente rotulado y guardar refrigerado.

2. Agua peptona al 0,1 % (m/v): Pesar 0,1 g de peptona universal y disolver en 1000 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7,0 con NaOH 1N o HCl 1N; depositar el volumen requerido en los recipientes de vidrio y esterilizar por 15 minutos a 15 psi.

3. Rojo congo al 1 % (m/v): Pesar 1 g de rojo congo y disolver en 100 mL de agua destilada. Depositar en un frasco de vidrio previamente rotulado y guardar refrigerado a 4°C.

4. Cloruro de sodio 2 M: Pesar 116,8 g de cloruro de sodio (NaCl) y disolverlos en 1000 mL de agua destilada. Depositar en un frasco de vidrio previamente rotulado y guardar refrigerado a 4°C.

5. Hidróxido de potasio 0,5 M: Pesar 28,05 g de KOH y disolverlos en 1000 mL de agua destilada. Depositar en un frasco de vidrio previamente rotulado y guardar refrigerado.

6. Solución de glucosa y cloruro de amonio: Pesar por separado 0,625 g de glucosa y 0,050 g de cloruro de amonio. Disolver en 1000 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a

116,9°C, 15 psi por 15 minutos. Preservar en un recipiente cerrado a 4°C.

7. Alochol eteílico al 20% (v/v): Medir 2,85 mL de alcohol al 70% (v/v) y mezclar con 97,15 mL de agua destilada. Preservar en un recipiente cerrado a 4°C.

8. Hipoclorito de Sodio al 2,5 % (v/v): Medir con pipeta 2,5 mL de hipoclorito comercial al 5% (v/v) y mezclar con 200 mL de agua destilada. Depositar en un frasco de vidrio previamente rotulado y guardar refrigerado a 4°C.

9. Ácido salicílico 5 % (m/v), disuelto en H_2SO_4 al 98% (v/v): Pesar 5 g de ácido salicílico y disolverlos en 100 mL de H_2SO_4 al 98 % (v/v). Guardar en frasco oscuro.

10. Hidroxido de sodio 2 N: Pesar 80 g de NaOH y mezclar lentamente con 1000 mL de agua destilada. La reacción es exotérmica se recomienda realizar una homogenización suave hasta que observar una disolución completa de las perlas de hidróxido. Depositar en un frasco de color ámbar previamente rotulado y guardar refrigerado a 4°C.

11.Solución stock de $(NH_4)_2SO_4$ de 1000 ppm: Pesar 1 g de nitrato de potasio y disolver en 1000 mL de agua destilada empelando un balón aforado de 1000 mL.

12. Solución A compuesta por la "Mezcla" + "Reactivo de color- CDR: compuesta por la "Mezcla" + "Reactivo de color- CDR" – Mezcla para 100 mL: 2,8 g $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ – Tartrato de sodio y potasio, 2,9 g $Na_3C_6H_5O_7$ – Citrato de sodio, 8 g NaOH. CDR para 100 mL: 100 mL de "Mezcla", 8 g $C_7H_5NaO_3$ – Salicilato de Sodio, 0,1 g $Na_2[Fe(CN)_5NO]$ – Nitroprusiato de Sodio.

13. Solución de hipoclorito de sodio al 0,2% (v/v): Medir con pipeta automática 4 mL de hipoclorito de sodio al 5 % (v/v) o comercial y disolver en 100 mL de agua destilada.

14. Reactivo de Nesler:
Solución A: Disolver 160 g de NaOH en 500 mL de agua destilada. Conservar en frasco ámbar bien sellado.

Solución B: Disolver 70 g de IK anhidro en un pequeño volumen de agua destilada y añadir 100 g de I^2Hg. Disolver y diluir con agua destilada hasta 500 mL. Conservar ámbar debidamente sellado. Finalmente, para obtener el reactivo de Nessler, mezclar en partes iguales las dos soluciones.

15. Reactivo de Gries:
Solución A: Disolver 0,5 g de ácido sulfanílico en 30 mL de ácido acético glacial y 120 mL de agua destilada. Filtrar si es necesario.

Solución B: Disolver 0,1 g de alfanaftil amina en 120 mL de agua destilada calentando, enfriar, agregar 30 mL de ácido acético glacial. Utilizar cámara de extracción y máscara de protección, los reactivos son cancerígenos. Si cualquiera de las dos soluciones toma color, agitar con 0,5 g de zinc en polvo y filtrar. Para obtener el reactivo de Griess, mezclar las dos soluciones y almacenar en frasco ámbar debidamente sellado.

15. Solución stock de KNO3 de 1000 ppm: Pesar 1 g de nitrato de potasio y disolver en 1000 mL de agua destilada empelando un balón aforado de 1000 mL.

16. *p*-nitrofenol 0,025 mM: Pesar 5,47 mg de 4-p-nitrofenol fosfato y disolver en 1000 mL de agua destilada. Preservar en un frasco ambar y refrigerado a 4°C.

17.Buffer universal MUB: Pesar 3,025 de Tris-(hidroximetil)-aminometano, 2,9 g de ácido maleíco, 3,5 g de ácido cítrico, 1,57 g de ácido bórico, 1 M de hidróxido de sodio, disolver en 122 mL de agua estilada. Posteriormente, agregar más agua destilada hasta completar 250 mL. La solución se almacena a 4°C en oscuridad.

18. Hidróxido de sodio 0,5 M: Disolver 20 g de hidróxido de sodio en 500 mL de agua destilada, Utilizar cámara de extracción y máscara de protección

19. Cloruro de calcio 0,5 M: Disolver 55, 49 g de CaCl2 en 1000 mL de agua destilada. Preservar en un frasco hermético y refrigerado.

20. *p*-nitrofenol (0,01 – 0,06 µmol/L): Pesar 0,001 mg de p-nitrofenol y disolver en 1000 mL de aguas destilada si se va utilizar la

concentración 0,01 µmol/L. Pesar 0,008 mg de p-nitrofenoly disolver en 1000 mL de agua destiladasiseva a utilizar la concentración de 0,06 µmol/L.

21.Buffer acetato de Sodio 200 mM: Pesar 16,4 mg de acetato de sodio y dislver en 1000 mL de agua destilada. Preserva en un frasco tapado y a 4°C.

22. Solución de ácido fítico: Pesar 1 g de ácido fítico y disover en 1000 mL de agua destilada.

23. Solución reveladora de fitasas

24. Acido cítrico 1 M: Disolver 192,1 g de ácido cítrico en 1000 mL de agua destilada, Preservar en un frasco hermético y refrigerado.

25. KOH (10 % m/v): Pesar 10 g de KOH y disolverlos en 100 mL de agua destilada.

26. H_2O_2 10 % o 30 % (v/v): Medir 10 mL de H_2O_2 al 30 % (v/v) y mezclarlos con 90 mL de agua destilada. Preservar en un frasco hermético y refrigerado.

27. HCl (1 % v/v): Mezclar 2,63 mL de HCl al 38% (v/v) con 97,37 mL de agua destilada. Preservar en un frasco hermético y refrigerado.

28. Azul de tripano (0,05% m/v): Pesar 0,05 g de azul de tripán y disolverlos en 100 mL de agua destilada. Preservar en un frasco hermético y refrigerado.

29. $NaHCO_3$ 0,5 M: Pesar 42 g de $NaHCO_3$ y disolver en 1000 mL de agua destilada. Preservar en frasco con tapa y en refrigeración de 4°C.

30. Solución patrón de KH_2PO_4: Se pesan 0.23g KH_2PO_4 y se afora con agua destilada hasta un volumen final de 1L. Esta solución madre corresponde a la concentración de 50 ppm. A partir de ella se obtiene soluciones estándar de 0, 0,5,1,1,5,2 y 2,5 ppm en agua destilada y se mantienen en refrigeración.

31. Reactivo A para fosforo: 12 gramos de Molibdato de potasio, son puestos en un balón aforado de 250 mL, aforando a 250 mL con agua destilada. Simultáneamente, en un balón aforado de 200 mL se agregan 0.2743 g de tartrato de potasio y antimonio se disuelven y se aforan con agua destilada. Finalmente, en un balón aforado de 2000 mL se adicionan las dos soluciones y se adiciona 1 L de ácido sulfúrico a 5N y finalmente se afora a un volumen de 2 L con agua destilada.

32. Reactivo B fosforo: Pesar 1,056 g de ácido ascórbico a un balón a forado de 200 mL y aforar hasta el volumen final con el reactivo A. Esta solución debe prepararse el mismo día en el que se utiliza (útil para 66 muestras).

33. Solucion de fofatos o solución A para la determinación de DBO_5: Disolver 8,5 g de KH_2PO_4, 21,75 g de K_2HPO_4, 33,4 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$, y 1,7 g de NH_4Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada y diluir a 1 L. El pH debe ser 7,2

34. Solución de sulfato de magnesio heptahidratado o solución B para la determinación de DBO_5: Disolver 22,5 g de $MgSO_4.7H_2O$ en agua destilada y diluir a 1 L.

35. Solución de cloruro de calcio o solución C para la determinación de DBO_5: Disolver 27,5 g de $CaCl_2$ en agua destilada y diluir a 1 L.

36. Solución de cloruro férrico hexahidratado o solución D para la determinación de DBO_5: Disolver 0,25 g de $FeCl_3.6H_2O$ en agua destilada, diluir a 1 L.

37. Inoculo para DBO_5: Mezclar 10 mL de una suspensión de *Pseudomonas* sp, 10 mL de *Bacillus* sp. y 10 mL de *Escherichia coli* en un frasco Schott de 100 mL y completar con 70 mL de solución salina al 0,85 % (m/v). Preparar cada vez que se vaya a realizar una determinación de la demanda química de oxígeno.

38. Ácido nalidíxico: Mezclar 250 mg de ácido nadilíxico con 2 mL de NaOH 1M y 8 mL de agua destilada, se esteriliza por filtración con filtros de membrana de 0,22 µm. de la solución anterior se adiciona 1 mL para cada 100 mL de medio (10 mL para un litro).

39. Cloruro de calcio 1 M: Pesar 14,6 g de $CaCl_2$ disuelva el cloruro de calcio en agua mientras se calienta suavemente, Enfríe a temperatura ambiente y esterilice por filtración a través de una membrana con poros de 0,2 µm, almacene en oscuridad a 5 +/- 3 °C por no más de 6 meses.

40.*p*-nitrofenol 0,1 M: Pesar 21,9 mg de 4-p-n itrofenol fosfato y disolver en 1000 mL de agua destilada. Preservar en un frasco ambar y refrigerado a 4°C.

41. buffer Tris-HCL buffer (0,05 M, pH 8,0).

42. Hidróxido de sodio 1 N: Pesar 40 g de NaOH y mezclar lentamente con 1000 mL de agua destilada. La reacción es exotérmica se recomienda realizar una homogenización suave hasta que observar una disolución completa de las perlas de hidróxido. Depositar en un frasco de color ámbar previamente rotulado y guardar refrigerado a 4°C.

43. Ácido clorhídrico al 1 N: Medir con pipeta de vidrio de 10 mL o probeta de 20 mL la cantidad necesaria para preparar 1000 mL de solución en agua destilada. La reacción es exotérmica se recomienda realizar una homogenización suave hasta que observar una disolución completa. Depositar en un frasco de color ámbar previamente rotulado y guardar refrigerado a 4°C.

Pontificia Universidad JAVERIANA Bogotá

Asociación porkcolombia

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA COMERCIAL