



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“BIODEGRADACIÓN DE DETERGENTES ANIÓNICOS
POR ENTEROBACTERIAS AUTÓCTONAS Y SU
APLICACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS.”**

Tesis presentada como requisito para obtener el título de

Licenciado en Ingeniería Ambiental

Presenta:

MARIANA HIDALGO AGUIRRE

Director de la Tesis:

M.C. JOSE ANTONIO TICANTE ROLDÁN

Co-Director de la Tesis:

M.C. REYNA DEL CONSUELO ALMIRAY PINZÓN

Puebla, Pue. Agosto 2017



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/553/2017

Asunto: Prórroga de Registro de Tema de Tesis

**C. MARIANA HIDALGO AGUIRRE
PASANTE DE LA LICENCIATURA
EN INGENIERÍA AMBIENTAL
P R E S E N T E:**

Por medio del presente me permito informarle de la Prórroga del Registro de Tema de Tesis Profesional de la Licenciatura en Ingeniería Ambiental cuyo título es el siguiente:

**“BIODEGRADACIÓN DE DETERGENTES ANIÓNICOS POR ENTEROBACTERIAS
AUTÓCTONAS Y SU APLICACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS.”**

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I	ANTECEDENTES
CAPÍTULO II	METODOLOGÍA
CAPÍTULO III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: M.C. JOSE ANTONIO TICANTE ROLDÁN
Co-Directora de Tesis: M.C. REYNA DEL CONSUELO ALMIRAY PINZÓN

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR TRES MESES A PARTIR DEL 15 DE JUNIO AL 15 DE SEPTIEMBRE DEL 2017.**

ATENTAMENTE
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., 15 de Junio del 2017


M.I.C MA. GPE. TITA VAZQUEZ DE LOS MONTEROS
SECRETARIA ACADÉMICA



C.c.p. Director de Tesis: M.C. José Antonio Ticante Roldán
C.c.p. Co-Directora de Tesis: M.C. Reyna del Consuelo Almiray Pinzón
C.c.p. Minutario Facultad de Ingeniería Química.

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251

CTAI01



**Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla**
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



CIUDAD UNIVERSITARIA

C.P. José Juan Morales Rodríguez
Director de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

ASUNTO:
**AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS**

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería Ambiental

Mariana Hidalgo Aguirre

Quién presenta como tema de tesis:

Biodegradación de detergentes aniónicos por enterobacterias autóctonas y su aplicación en suelos contaminados.

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 21 de Agosto de 2017

Director de Tesis
M.C. José Antonio Ticante Roldán

Agradecimientos

A mi familia que me ha enseñado que el trabajo duro se recompensa por sí solo y que no importa los problemas que se presenten hay que seguir avanzando.

A mis amigos Ale, Bety, Cristina, Isabel, Gerardo, Humberto y Karen Alí por escuchar todas mis quejas y enredos desde que empecé con la tesis, y también, por esos momentos en los que de alguna forma estuvieron conmigo durante las largas horas de trabajo. Especialmente a Karen Estefanía que sufrimos el trabajo y las tesis juntas, así como esos días en los que terminamos tan cansadas que ya no sabíamos ni qué decíamos.

A mis profesores por enseñarme tanto y hacerme recordar en cada momento por qué escogí esta carrera, que siempre se puede hacer algo para mejorar las cosas, que lo importante es la disposición y siempre hay que poner atención en los detalles.

A mis asesores y sinodales, que también me han enseñado tanto, por su tiempo, su paciencia y apoyo.

Resumen

Los componentes aniónicos y catiónicos como los contenidos en los detergentes pueden servir como nutrientes para diferentes tipos de microorganismos, como por ejemplo las enterobacterias. En este proyecto se realizó una evaluación del potencial de degradación por enterobacterias, aisladas de un suelo contaminado con limpiadores líquidos multiusos, de un detergente aniónico comercial de lavandería. Se utilizaron medios selectivos, pruebas bioquímicas, de catalasa, oxidasa y tinción de Gram para la identificación de su género y especie.

Para comprobar si las enterobacterias aisladas eran capaces de realizar la degradación del detergente en las muestras de suelo se observó su comportamiento al cambiar las condiciones de crecimiento, como la temperatura y las fuentes de carbono, con el fin de probar su adaptación en cultivos en placa para su posterior aplicación en ensayos de biotratibilidad y su inoculación en un suelo contaminado artificialmente. Para identificar como el contaminante afecta las características particulares del suelo con el que interactúa se realizaron pruebas fisicoquímicas en muestras de suelo contaminado artificialmente.

En las pruebas microbiológicas se identificaron las cepas *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa* con un alto potencial de degradación. Aunque *Pseudomonas aeruginosa* mostró mejores resultados en las pruebas de degradación en placa, *Serratia marcescens* fue superior en los análisis de biotratibilidad y de aplicación en suelo.

Índice de contenido

Agradecimientos	iv
Resumen	v
Índice de contenido	vi
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Abreviaturas	xii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Justificación	4
1.3 Hipótesis	5
1.4 Objetivo general	5
1.4.1 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	6
2.1 Tensoactivos de los detergentes aniónicos	7
2.2 Impacto en el ambiente	9
2.3 Biorremediación	11
2.4 Enterobacterias	12
2.4.1 Características generales	13
2.4.2 Clasificación	16
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	18
3.1 Toma de muestra	20
3.1.1 Determinaciones fisicoquímicas en campo	22
3.1.2 Preparación de las muestras	24

3.2 Pruebas microbiológicas	25
3.2.1 Aislamiento de enterobacterias autóctonas de las muestras	25
3.2.2 Identificación y caracterización	26
3.2.3 Pruebas de susceptibilidad	30
3.3 Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo contaminadas artificialmente	31
3.4 Aplicación de las enterobacterias degradadoras en el suelo	41
3.4.1 Análisis de biotratabilidad	42
3.4.2 Inoculación y monitoreo por espectrofotometría UV-Vis	42
3.5 Conservación de cepas	43
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 Toma de muestra	44
4.1.1 Determinaciones fisicoquímicas en campo	44
4.1.2 Preparación de las muestras	45
4.2 Pruebas microbiológicas	46
4.2.1 Aislamiento de enterobacterias autóctonas de las muestras	46
4.2.2 Identificación y caracterización	47
4.2.3 Pruebas de susceptibilidad	49
4.3 Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo contaminadas artificialmente	50
4.4 Aplicación de las enterobacterias degradadoras en el suelo	55
4.4.1 Análisis de biotratabilidad	55
4.4.2 Inoculación y monitoreo por espectrofotometría UV-Vis	62
4.5 Conservación de cepas	70
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	73

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentajes de producción de jabones según su utilización.	7
Tabla 2. Diferencias en el procedimiento de toma de muestra	21
Tabla 3. Distancia entre los puntos de muestreo	22
Tabla 4. Valoración de los halos de inhibición	30
Tabla 5. Resultados de las determinaciones en la muestra que se utilizará en el análisis.....	45
Tabla 6. Diferenciación de cultivos y conteo de colonias.....	46
Tabla 7. Resultados registrados en las pruebas bioquímicas	47
Tabla 8. Observaciones de los resultados de las pruebas bioquímicas	47
Tabla 9. Enterobacterias identificadas	47
Tabla 10. Resultados de las pruebas de sensibilidad de <i>Serratia marcescens</i> "A"	49
Tabla 11. Resultados de las pruebas de sensibilidad de <i>Serratia marcescens</i> "B"	49
Tabla 12. Resultados de las pruebas de sensibilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
Tabla 13. Resultados de la determinación de humedad, pH y CE.....	52
Tabla 14. Resultados de la densidad aparente, real y porosidad.....	53
Tabla 15. Valores en la determinación de color con las tablas de Munsell.....	53
Tabla 16. Contenido de materia orgánica y nitrógeno total	54
Tabla 17. Resultados en UMcF de <i>Serratia marcescens</i> "A"	56
Tabla 18. Resultados en UMcF de <i>Serratia marcescens</i> "B"	57
Tabla 19. Resultados en UMcF de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Tabla 20. Análisis de biotratibilidad de 16.00 ppm	59
Tabla 21. Análisis de biotratibilidad de 32.03 ppm	60
Tabla 22. Análisis de biotratibilidad de 48.04 ppm.....	60
Tabla 23. Análisis de biotratibilidad de 64.01 ppm.....	61
Tabla 24. Análisis de biotratibilidad de 80.14 ppm	62
Tabla 25. Concentración evaluada en el análisis.....	63
Tabla 26. Resultados en absorbancia de <i>Serratia marcescens</i> "A"	64
Tabla 27. Resultados en absorbancia de <i>Serratia marcescens</i> "B"	65
Tabla 28. Resultados en absorbancia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
Tabla 29. Resultados del monitoreo UV-Vis de 16.00 ppm.....	67
Tabla 30. Resultados del monitoreo UV-Vis de 32.03 ppm.....	67
Tabla 31. Resultados del monitoreo UV-Vis de 48.04 ppm.....	68
Tabla 32. Resultados del monitoreo UV-Vis de 64.01 ppm	69
Tabla 33. Resultados del monitoreo UV-Vis de 80.14 ppm	70

Índice de figuras

Figura 1. Estructura molecular de un surfactante	3
Figura 2. Estructura molecular del abs.....	8
Figura 3. Estructura molecular de un detergente las	8
Figura 4. Estructura del género <i>enterobacteriaceae</i>	13
Figura 5. Características típicas y distintivas de las enterobacterias.....	15
Figura 6. Clasificación de los géneros de la familia <i>enterobacteriaceae</i>	17
Figura 7. Esquema general de las etapas de la metodología.....	20
Figura 8. Ubicación del punto de muestreo del sitio contaminado	21
Figura 9. Ubicación del predio sin explotación previa.	21
Figura 10. Hueco en forma de v.	22
Figura 11. Retiro de los bordes de la muestra.	22
Figura 12. Procedimiento para determinar cloruros	23
Figura 13. Procedimiento para la determinación de sulfatos.....	23
Figura 14. Procedimiento cualitativo para arcilla naturalmente dispersa	23
Figura 15. Determinación de carbonatos	23
Figura 16. Procedimiento para la determinación de alcalinidad	23
Figura 17. Procedimiento cualitativo para materiales alofánicos y/o complejos orgáno-aluminicos.....	23
Figura 18. Procedimiento para materia orgánica y manganeso	24
Figura 19. Procedimiento para determinar la infiltración.....	24
Figura 20. Diagrama de la preparación de las muestras.	24
Figura 21. Diluciones seriadas.....	26
Figura 22. Diagrama de resumen de la metodología	26
Figura 23. Método de siembra de las pruebas bioquímicas	27
Figura 24. Resumen de la metodología de la prueba de la oxidasa	28
Figura 25. Resumen del procedimiento de la prueba de catalasa.....	28
Figura 26. Diagrama de procedimiento de la tinción de gram.....	29
Figura 27. Diagrama de resumen de la metodología	30
Figura 28. Resumen del procedimiento en la contaminación artificial de la muestra	32
Figura 29. Procedimiento para la determinación de humedad	33
Figura 30. Procedimiento en la preparación de las muestras para los análisis	33
Figura 31. Resumen de la metodología en la determinación de color	34
Figura 32. Procedimiento del método de Yoder.....	35

Figura 33. Procedimiento del método electrométrico para medir pH y CE.....	36
Figura 34. Procedimiento para la determinación de densidad aparente.....	37
Figura 35. Procedimiento para la determinación de densidad real.....	38
Figura 36. Proceso de degradación de la materia orgánica de la muestra.....	39
Figura 37. Procedimiento después de degradar la materia orgánica de la muestra.....	39
Figura 38. Procedimiento en la determinación de materia orgánica.....	40
Figura 39. Procedimiento del método micro-Kjeldahl modificado por bremner.....	41
Figura 40. Prueba de biotratibilidad.....	42
Figura 41. Resumen del procedimiento de inoculación.....	43
Figura 42. Metodología en la conservación de cepas.....	43
Figura 43. Técnica de muestreo en el sitio sin explotación.....	44
Figura 44. Traslado y almacenamiento de las muestras.....	45
Figura 45. Cultivos axénicos bacterianos.....	46
Figura 46. Cultivos axénicos de <i>Serratia marcescens</i> “A”, <i>Serratia marcescens</i> “B” y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	48
Figura 47. Cultivos axénicos en agar cled.....	48
Figura 48. Cepas de <i>serratia marcescens</i> y <i>pseudomona aeruginosa</i> en agar soya tripticaseína y cetrimida respectivamente.....	48
Figura 49. Resultados de la pruebas de sensibilidad después de 72hrs.....	50
Figura 50. Procedimiento de la contaminación de la muestra sin explotación previa.....	51
Figura 51. Triángulo de las texturas con los resultados obtenidos.....	54
Figura 52. Análisis de biotratibilidad de <i>Serratia marcescens</i> “A”.....	56
Figura 53. Análisis de biotratibilidad de <i>Serratia marcescens</i> “B”.....	57
Figura 54. Análisis de biotratibilidad de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	58
Figura 55. Análisis de biotratibilidad de 16.00 ppm.....	59
Figura 56. Análisis de biotratibilidad de 32.03 ppm.....	60
Figura 57. Análisis de biotratibilidad de 48.04 ppm.....	61
Figura 58. Análisis de biotratibilidad de 64.01 ppm.....	61
Figura 59. Análisis de biotratibilidad de 80.14 ppm.....	62
Figura 60. Proceso de inoculación en suelo.....	63
Figura 61. Resultados del monitoreo UV-Vis de <i>Serratia marcescens</i> “A”.....	64
Figura 62. Resultados del monitoreo UV-Vis de <i>Serratia marcescens</i> “B”.....	65
Figura 63. Resultados del monitoreo UV-Vis de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	66
Figura 64. Resultados del monitoreo UV-Vis para 16.00 ppm.....	67

Figura 65. Resultados del monitoreo UV-Vis para 32.03 ppm	68
Figura 66. Resultados del monitoreo UV-Vis para 48.04 ppm	68
Figura 67. Resultados del monitoreo UV-Vis para 64.01 ppm	69
Figura 68. Resultados del monitoreo UV-Vis para 80.14 ppm.....	70
Figura 69. Inóculos en tubos eppendorf	70

Abreviaturas

ABS: Sulfonato de Alquil Benceno

CE: Conductividad Eléctrica

LAS: Alquilsulfonato Lineal

LIA: Agar Lisina Hierro

LPS: Lipopolisácaridos

MIO: Movilidad Indol Ornitina

N: Nitrógeno

P: Fósforo

PCB: Bifenoles Policlorados

pH: Potencial Hidrógeno

ppm: partes por millón

PTAR: Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales

S: Azufre

SLS: Lauril Sulfato Sódico

TSI: Agar Triple Azúcar Hierro

UMcF: Unidades McFarland

UFC: Unidad Formadora de Colonias

UV-Vis: Región Ultravioleta – Visible del espectro electromagnético

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El término biodegradación se utiliza para describir las transformaciones químicas hechas por microorganismos, incluyendo las que producen compuestos más complejos que los de partida o la oxidación completa de los compuestos orgánicos a CO_2 , H_2O , NO^- , y otros componentes inorgánicos (Atlas & Bartha, 2002).

El aumento de la población y el desarrollo industrial durante el siglo XX elevaron la presencia de contaminantes sólidos y líquidos convencionales a niveles críticos (Atlas & Bartha, 2002). La industria química produce una gran cantidad de compuestos xenobióticos, algunos con grupos halógenos y nitrogenados, utilizados como propelentes, refrigerantes, disolventes, bifenoles policlorados (PCB), plásticos, detergentes, explosivos y plaguicidas que son resistentes (recalcitrantes) a la biodegradación (Atlas & Bartha, 2002).

El suelo es un recurso vivo y dinámico no-renovable, vital para la producción agrícola, es el principal receptor y transformador de residuos industriales, agrícolas y urbanos; se considera como un filtro regulador de la calidad del medio ambiente (Ruda de Schenquer, Mongiello, & Acosta, 2004).

La contaminación del suelo consiste en una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de su productividad como consecuencia de la acumulación de sustancias tóxicas en concentraciones que superan el poder de amortiguación natural del suelo y que modifican negativamente sus propiedades; como consecuencia de actividades humanas, o de forma natural cuando los procesos de edafización liberan elementos químicos contenidos en las rocas y los concentran en el suelo alcanzando niveles tóxicos (Ortiz, Dorado, & Villar, 2006).

La salud del suelo puede definirse como su habilidad de funcionar y alcanzar su potencial, considerando los cambios en el tiempo provocados por el uso y manejo humano o por eventos naturales (Ruda de Schenquer, Mongiello, & Acosta, 2004).

La biodegradación, por su versatilidad, tiene mayor aplicación como regulador de la salud del suelo ya que puede llevarse a cabo en el laboratorio o en el sistema natural, en medios sólidos o líquidos.

Los detergentes

Antes de la primera guerra mundial los jabones se elaboraban a partir de grasas naturales y aceites, sin embargo, la guerra ocasionó una escasez de estas y fue necesario el desarrollo de “jabones sintéticos” o detergentes.

Los detergentes son compuestos químicos sintéticos, su comportamiento específico en solución, los hace adecuados para eliminar la suciedad de las superficies; son utilizados como agentes limpiadores, industriales y en el desarrollo de otras actividades humanas (Manahan, 2007). Las moléculas de los detergentes sintéticos se parecen lo suficiente a las de los jabones como para tener la misma acción limpiadora, pero son lo bastante diferentes como para resistir los efectos ácidos y las aguas duras (Hill & Kolb, 1999).

Su componente más importante es el surfactante o agente superficial activo (tensoactivo), que actúa haciendo que el agua sea más “húmeda” y mejor agente de limpieza. Los surfactantes se concentran en la interfase del agua con los gases (el aire), los sólidos (la suciedad) y los líquidos inmiscibles (el aceite) debido a su estructura anfifílica (Figura 1) lo que significa que una parte de la molécula es un grupo polar (hidrofilo) y la otra parte es un grupo hidrocarburo (hidrofóbo) (Manahan, 2007); pueden contener aditivos como los intercambiadores de iones, álcalis (carbonato de sodio), silicatos de sodio anticorrosivos, estabilizadores de espuma de amida, carboximetilcelulosa para la formación de suspensiones de partículas de suelo,

blanqueadores, suavizantes de tejidos, enzimas, abrillantadores ópticos, fragancias, tintes y sulfato de sodio como diluyente (Manahan, 2007).

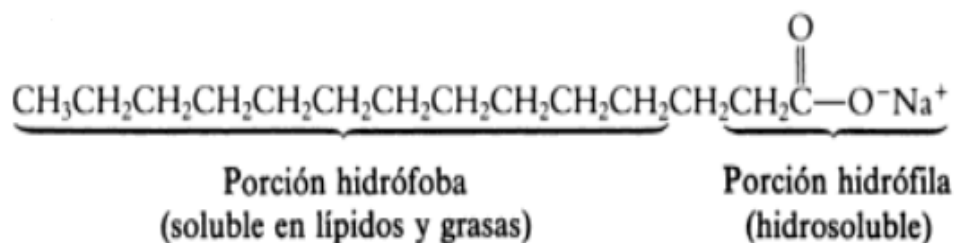


Figura 1. Estructura molecular de un surfactante

1.1 Planteamiento del problema

Los detergentes son considerados contaminantes ambientales problemáticos ya que poseen estructuras químicas aromáticas complejas (Rittman, 2001). El surfactante no sufre ninguna transformación química durante el proceso de lavado (ERASM, 2009), se acumula en los suelos cambiando sus propiedades alterando la vida de plantas y microorganismos.

Los detergentes aniónicos son los más utilizados al considerarse como biodegradables, su versatilidad y bajos costos. Una cantidad considerable de surfactantes aniónicos son liberados en el ambiente causando serios problemas de contaminación en ríos y mares; su concentración varía de acuerdo a la época del año y a la distancia de las zonas residenciales (Cserhádi, Forgács, & Oros, 2002).

Las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) incorporan el efluente con surfactantes al cauce del río, ocasionando una contaminación en los suelos y en los cuerpos de agua.

Estos detergentes producen alteraciones en los suelos, ya que pueden estabilizarse en períodos de tiempo variables sin descomponerse y su presencia puede favorecer la penetración de otras sustancias contaminantes (Seoáñez, 1999). Las investigaciones científicas normalmente se enfocan en la contaminación producida a los cuerpos de agua, olvidando la que pudiera producirse en el suelo por su interacción.

1.2 Justificación

Los detergentes son producidos sintéticamente, siendo el ingrediente activo un surfactante o agente de superficie activa polar de naturaleza aniónica, catiónica o no-iónica y una base de grasas animales, derivados de la petroquímica o derivados únicamente del petróleo. Tienen una variedad de aplicaciones domésticas y comerciales, incluyendo líquidos lavaplatos, productos de lavandería y artículos de tocador (Department of the Environment, 1995).

El suelo es la capa superficial de la tierra donde se desarrollan las raíces de las plantas, conocido también como la capa arable o vegetal que contiene materia viva y sirve de soporte para la vegetación en campo abierto y en lugares transformados por la actividad humana (León, 2000).

Los residuos de detergentes en el suelo representan un grave problema, ya que las propiedades fisicoquímicas del suelo y las características de su microbiota pueden verse alteradas. Ruiz, Prats y Rico (1989) mencionan que al realizar procesos de secado y composteo en biosólidos de las PTAR la degradación del Alquilsulfonato lineal (LAS) por microorganismos en condiciones aeróbicas es del 97% al 99%.

Actualmente no se realizan análisis de suelos contaminados con detergentes aniónicos por lo que este proyecto, mediante la contaminación artificial de una muestra de suelo con un detergente aniónico comercial de lavandería, permitió observar su comportamiento y determinar el potencial de degradación por enterobacterias aisladas de un suelo contaminado por limpiadores, para evaluar su utilización como remediadores.

1.3 Hipótesis

Las enterobacterias autóctonas de un suelo contaminado con limpiadores líquidos multiusos son capaces de degradar un detergente aniónico comercial de lavandería.

1.4 Objetivo general

- Determinar si las enterobacterias aisladas de una muestra de suelo contaminado con limpiadores líquidos multiusos pueden degradar un detergente aniónico comercial de lavandería.

1.4.1 Objetivos específicos

- ✓ Aislar e identificar las enterobacterias del suelo contaminado.
- ✓ Contaminar cinco muestras de suelo sin explotación previa con concentraciones de 16.00, 32.03, 48.04, 64.01 y 80.14 ppm de un detergente aniónico comercial de lavandería.
- ✓ Caracterizar fisicoquímicamente las muestras de suelo contaminadas artificialmente, utilizando como patrón una muestra no contaminada.
- ✓ Realizar un ensayo de biotratibilidad y una inoculación en las muestras de suelo contaminado artificialmente.
- ✓ Comprobar la degradación del detergente aniónico por medio del crecimiento bacteriano.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

El primer tensoactivo conocido se documentó en la civilización sumeria alrededor del año 2500 a.c. En 1790, Nicolás Leblanc desarrolló el proceso de fabricación del jabón (Universidad Politécnica de Catalunya BarcelonaTech, 2011). El primer tensoactivo sintético, lauril sulfato sódico (SLS) se sintetizó en el laboratorio por Dumas y Peligot en 1830; sin embargo, hasta el siglo siguiente se contó con la tecnología necesaria para su producción a escala industrial (López Mahía, Muniategui, & Prada Rodríguez, 2005).

La elaboración de detergentes tuvo un aumento después de la primera guerra mundial; fueron populares con los fabricantes porque el precio del petróleo crudo era más estable que el de los aceites vegetales y a los clientes les gustaba porque no creaba escorias en aguas duras (Department of the Environment, 1995).

Sin embargo, para 1960, los detergentes que se mezclaban con los ríos provenientes de descargas de aguas residuales causaron serios problemas por la formación de espuma. La espuma era un problema tanto ambiental como estético porque reducía la disponibilidad de oxígeno en la interface aire-agua. El problema se debía a que en el tratamiento de aguas residuales no se degradaban surfactantes de cadenas ramificadas de hidrocarburos que al alcanzar condiciones turbulentas y de agitación en las aguas residuales producían la espuma. Esto tuvo como consecuencia el utilizar moléculas de cadena no ramificada que eran biodegradables en tratamientos (Department of the Environment, 1995).

En los años siguientes se observó una proliferación de nuevas fórmulas de todo tipo y una gran diversificación en los usos industrial y doméstico. La producción de jabones dejó de crecer y su uso dentro de productos industriales o productos cosméticos no medicinal aumentó rápidamente. Los surfactantes catiónicos y anfóteros aparecieron en el mercado, pero su utilización se limitó a aplicaciones particulares por su alto costo (Salager, 2002).

Hace diez años el mercado se estabilizó y se repartió como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de producción de jabones según su utilización.

33% Jabones, carboxilatos, lignosulfonatos	50% Jabones de uso doméstico
	35% Otros ácidos de uso industrial
22% Detergentes sintéticos del tipo sulfonato o sulfato	50% Uso doméstico (polvos, líquidos)
	17% Industria petrolera
	7% Aditivos de cementos
	4% Agro-alimentos
	3% Cosméticos, productos farmacéuticos
40% No iónicos etoxilados o etoxisulfatos	40% Alcoholes etoxilados
	20% Alquil fenol etoxilados
	15% Éteres de ácidos grasos
	10% Derivados de aminas o amidas
4% Catiónicos	Amonios cuaternarios
1% Anfóteros	Betaínas y derivados de aminoácidos.

Fuente: Salager, J. (2002). *Surfactantes*. Caracas: Universidad de los Andes.

2.1 Tensoactivos de los detergentes aniónicos

Las formulaciones de los detergentes, contienen agentes que forman complejos y que se añaden para secuestrar al Calcio y funcionar como formadores; un detergente sólido comercial contiene sólo de 10 a 30% de surfactante (Manahan, 2007). Los tensoactivos de los detergentes aniónicos son los sulfonatos alquilbencílicos, una molécula con un extremo polar (sulfonato) y otra no polar (grupo alquilo) (Atlas & Bartha, 2002).

∞ *Sulfonato de alquil benceno (ABS)*

Hasta los primeros años de la década de los 60 del Siglo XX, el ABS era el surfactante más usado en las formulaciones de detergentes. Elaborado a partir de productos del petróleo (propileno y benceno) y ácido sulfúrico, como producto de la reacción se obtiene ácido sulfónico (RSO_3H) que se neutraliza con una base (carbonato de sodio) para dar el producto final (Hill & Kolb, 1999); ya que su estructura es en cadena ramificada su biodegradación es muy lenta (Figura 2).

Tienen cadenas lineales de átomos de carbono por lo que los microorganismos pueden descomponer su molécula produciendo enzimas que la degraden separando dos (y sólo dos) átomos de carbono a la vez. La cadena ramificada de las moléculas de ABS bloquea esta acción enzimática, lo que impide su degradación (Hill & Kolb, 1999).

Formulaciones de detergentes para lavandería

Los productos detergentes comerciales, para uso doméstico y de lavandería, contienen moléculas de LAS y otras sustancias que mejoran la detergencia, blanquean, reducen la redepósito de la suciedad, abrillantan o simplemente reducen el costo (Hill & Kolb, 1999).

Cualquier sustancia que se agrega a un tensoactivo para aumentar su detergencia se denomina carga. Una carga común que se utilizaba pero ahora está prohibida o restringida en muchas áreas son los fosfatos; actualmente se utiliza el carbonato de sodio y aluminosilicatos complejos (zeolitas) (Hill & Kolb, 1999).

2.2 Impacto en el ambiente

Los surfactantes y otros ingredientes asociados con las formulaciones de los detergentes son descargados al drenaje que, en la mayoría de los casos, está conectado a una tubería que conduce a una planta de tratamiento (ERASM, 2009). Su potencial para contaminar el agua es alto debido a su uso extensivo en distintos mercados, tanto de consumidores como en ámbitos institucionales e industriales; anualmente se consumen más de cuatrocientos cincuenta millones de kilogramos de detergentes en el mercado doméstico de los Estados Unidos y algo más en Europa.

Los productos que una vez utilizados se dispersan en el medio ambiente deben diseñarse para que se descompongan rápidamente en productos inoocuos (Manahan, 2007). Sin embargo los detergentes, a diferencia de los jabones, tienden a ser biodegradados con menos facilidad; particularmente cuando sus cadenas alquílicas están ramificadas (Stermitz & Weininger, 1988).

Los primeros detergentes tenían cadenas alquílicas altamente ramificadas y eran extremadamente resistentes al ataque microbiano. Su falta de biodegradabilidad dio lugar a espumas en ríos y lagos por lo que fueron prohibidos y sustituidos por alquilbencenosulfonatos menos ramificados; incluso estos dejan algo que desear en cuanto a su biodegradabilidad (Stermitz & Weininger, 1988).

Los detergentes domésticos fueron una vez la fuente habitual de fosfatos en las aguas residuales, el control de la eutrofización se ha concentrado en la eliminación de los fosfatos de los detergentes en las plantas de tratamiento de aguas de alcantarillado impidiendo al efluente cargado de fosfatos entrar en los sistemas de agua donde posibilita el crecimiento excesivo de algas resultado de la eutrofización (Manahan, 2007).

El ciclo de vida de los animales acuáticos se ha visto influenciado por los surfactantes aniónicos; Versteeg et al. (1997) realizaron cálculos que indican que la toxicidad aumenta con el largo de la cadena alquílica sin importar la clase de surfactante mientras que, Roy (1988) demostró que las altas concentraciones de surfactantes han modificado el comportamiento de los peces (movimientos erráticos, espasmos musculares, torsiones corporales).

Además, los surfactantes mostraron indicios de toxicidad que puede causar contaminación ambiental ya que pueden destruir las proteínas modificando la actividad de varias enzimas u otros constituyentes de la célula causando mal funcionamiento. No solo las bacterias, plantas e invertebrados acuáticos son sensibles a los surfactantes aniónicos si no que los vertebrados también pueden mostrar síntomas de toxicidad típica (Cserhádi, Forgács, & Oros, 2002).

La contaminación de sólidos como el suelo, sedimentos, lodos activados, etc. ha sido demostrada con frecuencia. Las propiedades de filtración y dispersión influyen con la movilidad del surfactante, dependiendo de su concentración, en la movilidad de

moléculas orgánicas y en sistemas orgánicos. Huang et al (1997) reportaron que la desorción de las partículas de suelo puede incrementarse con la adición de surfactantes aniónicos (Cserhádi, Forgács, & Oros, 2002).

Es necesario realizar un estudio sobre la adsorción de contaminantes en suelos para entender su comportamiento (Monkiedje y Spiteller, 2002). En la práctica, los surfactantes encontrados en suelos son mezclas variables debido al uso de diferentes tipos de surfactantes (Rao & He, 2006).

Los surfactantes pueden absorberse en los suelos y afectar las propiedades biológicas y físico-químicas del suelo, incluyendo la estabilidad de agregados (Piccolo y Mbagwu, 1989), conductividad hidráulica de los suelos (Allred y Brown, 1994), retención de agua (Karagunduz et al., 2001) y el metabolismo de los microorganismos del suelo (Kuhnt, 1994; Wang et al., 2005).

Pueden afectar la adsorción, movilidad y degradación de otras sustancias orgánicas en los suelos (Sánchez-Camazano et al., 1995; Iglesias-Jiménez et al., 1996; Krogh et al., 2003; Zhao et al., 2005). Urano et al. (1984) reportó que existe una correlación entre la adsorción de surfactantes y el contenido de carbón orgánico en los suelos.

2.3 Biorremediación

La biodegradación es el proceso natural por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas transformándolas en moléculas más pequeñas y no tóxicas. Sin embargo, este proceso es muy lento y puede acelerarse introduciendo determinadas bacterias o plantas en ambientes contaminados. Esta intervención se denomina “Biorremediación” o “biocorrección” y se define como el empleo de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes del suelo o del agua (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2007).

La Biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante la adaptación de microorganismos capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrios en el medio ambiente (Sancho, 2008).

Se emplean mezclas de microorganismos o cepas definidas de bacterias y hongos. Básicamente, estos procesos pueden ser de tres tipos: la degradación enzimática, la remediación microbiana y la fitorremediación (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2007).

Interacción microbiana con Sulfonatos alquilbencílicos

Los ABS son más fáciles de fabricar y tienen propiedades detergentes ligeramente superiores. Sin embargo, la ramificación de la cadena de alquilo interfiere con su degradación porque los átomos de carbono terciario bloquean la secuencia normal de β -oxidación lo que los hace resistentes a la biodegradación y producen gran cantidad de espuma en ríos que los reciben como residuos (Larson, 1990).

El problema de la biodegradación restringida de los ABS, se alivió considerablemente cuando la industria comenzó a fabricar los LAS, que se degradan más fácilmente. El caso de los ABS-LAS fue uno de los primeros ejemplos de rediseño de una molécula sintética para eliminar los obstáculos que impedían su biodegradación, preservando esencialmente las características útiles del compuesto (Brenner, 1969).

2.4 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, Enterobacterias, 2010).

Dentro de esta familia se encuentran algunos de los agentes causales más importantes de enfermedad gastrointestinal, no obstante la mayor parte de la especie no son patógenos intestinales si no microorganismos oportunistas que pueden infectar cualquier sitio del organismo cuando encuentran un huésped alterado (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994).

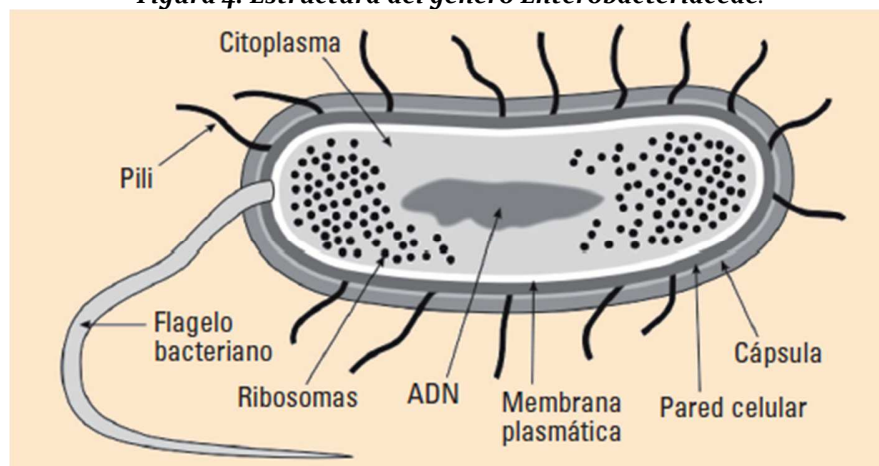
2.4.1 Características generales

Su taxonomía se ha estudiado más que la de cualquier otro grupo de microorganismos, las nuevas especies están siendo descritas y denominadas con una velocidad aparentemente rápida. En 1972 existían sólo 26 especies de *Enterobacteriaceae* con nombre, mientras que, para 1994 existían 86 especies con sus respectivos nombres y 11 grupos de microorganismos denominados como grupos entéricos que necesitan un estudio más profundo antes de asignarles un nombre de especie (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994).

Morfología

Son microorganismos con forma de bastón (Figura 4), por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010).

Figura 4. Estructura del género *Enterobacteriaceae*.



Fuente: Puerta-García y Mateos-Rodríguez (2010). Enterobacterias. España: Revista Medicine.

La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa, la interna de fosfolípidos que regulan el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas, y, la externa que consiste de un peptidoglicano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas.

La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglicano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa.

Los bacilos entéricos pueden poseer una cápsula bien definida, como se ve en el caso del género *Klebsiella*, o una cubierta laxa, y mal definida conocida como cubierta mucosa, o pueden carecer de cualquiera de estas estructuras. La pared celular está compuesta por mureína, lipoproteína, fosfolípido, proteína y LPS, tiene una disposición laminar (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994).

Características bioquímicas y de cultivo

Son microorganismos facultativos con diversidad bioquímica. Cuando se desarrollan en anaerobiosis o en atmósferas con baja tensión de oxígeno fermentan los hidratos de carbono; pero cuando se les ofrece suficiente cantidad de oxígeno utilizan el ciclo del ácido tricarboxílico y el sistema de transporte de electrones para la producción de energía. Por definición, todos los miembros de la familia fermentan glucosa, reducen nitratos a nitritos pero no licuan el alginato y son oxidasa negativos. Casi todos los bacilos entéricos fermentan la glucosa por la vía ácida mixta, pero los miembros de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* utilizan la vía fermentativa del butanodiol. Las distintas especies difieren en los hidratos de carbono que fermentan y estas diferencias, junto con las variaciones en la producción del producto terminal y en la utilización del sustrato, constituyen la base para la determinación de las especies dentro de esta familia.

Se han ideado diversos medios selectivos y diferenciales para el aislamiento y la diferenciación de esta familia. Los medios selectivos en un principio fueron ideados para el aislamiento de patógenos entéricos de los géneros *Salmonella* y *Shigella* a partir de materia fecal, en tanto que los medios diferenciales se pensaron para inhibir de forma selectiva los microorganismos grampositivos y para separar los bacilos entéricos en categorías amplias por su capacidad de fermentar hidratos de carbono seleccionados como la lactosa. En la Figura 5 se resumen las características distintivas, bioquímicas y de cultivo, de la familia Enterobacter.

Anaerobios facultativos
Reducen los nitratos a nitritos (con algunas excepciones)
No licuan el alginato
Fermentan la glucosa a ácido con producción de gas o sin ella
Son oxidasa negativos, a excepción de plesiomonas
Producen catalasa
La presencia de NaCl no favorece su crecimiento
La mayoría son móviles (con flagelos peritricos)
No formadores de esporas

Figura 5. Características típicas y distintivas de las enterobacterias

Resistencia

Como los bacilos entéricos no producen esporas, son destruidos con relativa facilidad por el calor y por concentraciones bajas de los germicidas y desinfectantes comunes. Los compuestos fenólicos, el formaldehído, el β -glutaraldehído y los compuestos halogenados son bactericidas, pero los compuestos de amonio cuaternario pueden actuar sólo como bacteriostáticos, lo que depende de la fórmula particular y de la situación en la cual se los utiliza. Los bacilos entéricos también son relativamente sensibles a la desecación pero pueden sobrevivir durante periodos prolongados si se les proporciona una humedad adecuada.

Determinantes de la patogenicidad

- *Endotoxina*: El LPS de la pared celular es tóxico para los animales, sus blancos celulares son variados y su mecanismo de acción exacto no ha sido definido.
- *Enterotoxina*: Son toxinas que por lo general afectan el intestino delgado, donde causan una transducción de líquido hacia la luz intestinal y la consiguiente diarrea.
- *Factores de colonización*: Las propiedades de la superficie celular de ciertos bacilos entéricos son importantes para el establecimiento de los microorganismos en el huésped.
- *Otros factores*: Algunos bacilos entéricos producen otras toxinas, enzimas y hemolisinas que inducen una variedad de efectos en diferentes sistemas experimentales.

2.4.2 Clasificación

Históricamente se dividen en patógenos oportunistas y patógenos intestinales (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994). En la Figura 6 se presenta la clasificación de sus géneros.

- ∞ *Patógenos oportunistas*: La mayoría de las infecciones causadas por estos microorganismos no comprometen el tracto gastrointestinal; todos los bacilos entéricos oportunistas son capaces de causar enfermedades similares a las de los patógenos intestinales pero la epidemiología, frecuencia, gravedad y el tratamiento de estas enfermedades difieren para las distintas especies (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994).
- ∞ *Patógenos intestinales*: Contiene los géneros *Salmonella* y *Shigella*, que se encuentran entre las causas principales de la diarrea bacteriana. Aunque infectan a los mismos sistemas orgánicos, difieren mucho en sus propiedades microbiológicas, epidemiológicas y patológicas (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994).

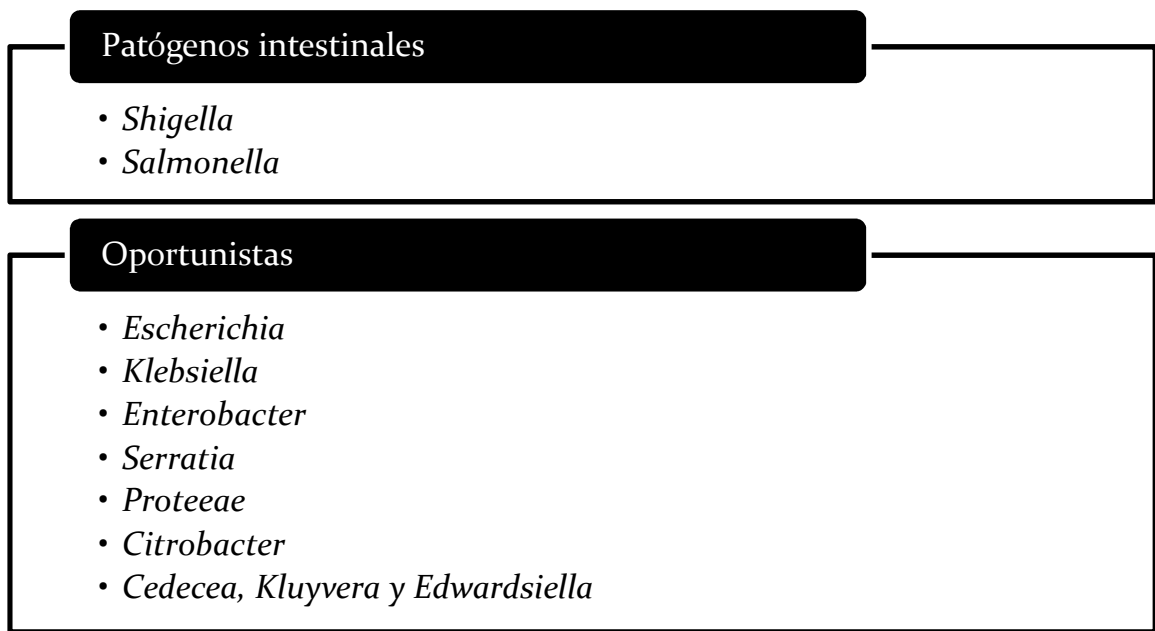


Figura 6. Clasificación de los géneros de la familia Enterobacteriaceae

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

Lista en orden alfabético de los materiales y reactivos utilizados en los análisis

Materiales

- Agitador de vidrio
- Agitador magnético
- Asa microbiológica
- Botes de aluminio con tapa
- Bureta de 100 ml
- Cajas Petri
- Cronómetro
- Embudo de plástico
- Fotografía aérea de la zona de muestreo
- Gradilla
- Hidrómetro de Bouyoucos
- Marcador indeleble
- Matraz aforado de 100 ml
- Matraz Erlenmeyer de 250ml
- Matraz Erlenmeyer de 500ml
- Mazo de madera
- Mechero de Bunsen
- Micropipeta 100µl
- Mortero de porcelana
- Pala recta sin óxido
- Papel filtro
- Picnómetro de 25 ml
- Pinzas estériles
- Pipeta de 1 ml
- Pipeta de 10 ml
- Portaobjetos
- Placa de porcelana con huecos
- Probeta de 10 ml
- Probeta de 25 ml
- Probeta de 250 ml
- Probeta de 1L
- Tablas de color de Munsell
- Tamiz de acero inoxidable de malla <2mm
- Termómetro
- Tubos eppendorf de 5 ml
- Tubos de ensaye de 3 ml
- Tubos de ensaye de 5 ml
- Tubos de ensaye de 10 ml
- Vaso de precipitado de 100ml
- Vaso de precipitado de 200ml
- Vaso de precipitado de 250ml
- Vaso de precipitado de 500ml
- Vidrios de reloj

Agares

- Agar MacConkey
- Agar CLED
- Agar Cetriamida
- Agar Soya Trypticaseína
- Agar TSI
- Agar LIA
- Medio MIO
- Agar Citrato
- Agar bacteriológico

Reactivos

- Aceite de inmersión
- Ácido clorhídrico (HCl) al 11%
- Ácido fosfórico concentrado
- Ácido sulfúrico concentrado
- Agua destilada
- Agua destilada y hervida (fría)
- Alcohol cetona
- Cloruro de Bario (BaCl_2) al 10%
- Cristal violeta
- Dicromato de Potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a 1N
- Fluoruro sódico (NaF) 1N
- Glicerol
- Hexametáfosfato sódico ($(\text{NaPO}_3)_6$) 0.2 N
- Hexametáfosfato sódico ($(\text{NaPO}_3)_6$) al 5%
- Indicador de difenilamina
- Lugol
- Nitrato de plata (AgNO_3) al 5%

- Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 30%
- Safranina
- Sensidisco con citocromo oxidasa
- Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%
- Soluciones estándar de pH
- Sulfato ferroso a 1M
- Reactivo de Kovac

Equipos

- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Densitómetro
- Desecador de vacío
- Espectrófotometro
- Estufa con circulación forzada de aire y temperatura controlada
- Incubadora
- Microscopio óptico con objetivo de 100X
- Parrilla de agitación
- Potenciómetro

Se implementaron técnicas experimentales para la comprobación de la hipótesis, utilizando una muestra de suelo contaminado con limpiadores líquidos multiusos para realizar las pruebas microbiológicas y seis de un suelo sin explotación previa, una como patrón y cinco contaminadas artificialmente con un detergente aniónico comercial de lavandería en concentraciones de 16.00, 32.03, 48.04, 64.01, 80.14 ppm respectivamente.

Los análisis se llevaron a cabo durante un periodo de 6 meses en el Laboratorio de Biotecnología e Instrumentación del Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas del Instituto de Ciencias (DICA-ICUAP), el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Química y el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, todos pertenecientes a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los materiales y reactivos necesarios fueron proporcionados por los mismos. A continuación se describe la metodología utilizada y sus fundamentos teóricos (Figura 7).

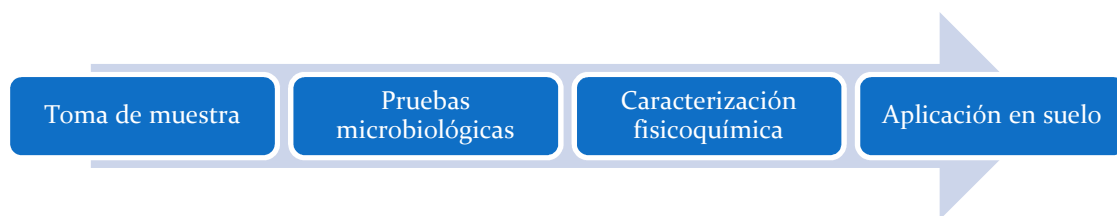


Figura 7. Esquema general de las etapas de la metodología

3.1 Toma de muestra

Delimitación de las áreas

Se recorrió el predio, se hizo un plano o croquis sencillo de las superficies más o menos homogéneas, el tipo de suelo, apariencia física, detalles importantes del lugar, como partes altas o bajas, planas o inclinadas, coloración del suelo, si es arenoso o pesado, vegetación alta, media o baja.

Para delimitar las áreas de muestreo, se ubicaron con un sistema de mapeo digital mediante el uso de coordenadas. El sitio contaminado del cual se realizó el aislamiento de enterobacterias se encuentra en la Facultad de Ingeniería Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con coordenadas geográficas 19°00'12.5"N 98°12'10.9"W (Figura 8); el sitio sin explotación previa que se utilizó en el análisis se ubicó en la prolongación de la 16 de Septiembre número 11512 colonia Granjas Puebla se le delimitó con coordenadas geográficas 18°59'02.7"N 98°13'57.3"W (Figura 9); ambos sitios se encuentran en la Ciudad de Puebla, Puebla.



Figura 8. Ubicación del punto de muestreo del sitio contaminado



Figura 9. Ubicación del predio sin explotación previa.

Toma de submuestras

Se recorrió el terreno en forma de zig-zag y cada 15 o 30 pasos se tomó una submuestra, limpiando la superficie del terreno, se realizó una planeación del número de puntos en que se realizaría el muestreo en relación al área total del predio (Tabla 2).

Tabla 2. Diferencias en el procedimiento de toma de muestra

Sitio contaminado	Sitio sin explotación
Submuestras superficiales	20 a 30 cm de profundidad de las submuestras
3 puntos de muestreo	5 puntos de muestreo

Para realizar los muestreos compuestos en forma de zig-zag se registró la distancia entre cada punto (Tabla 3).

Tabla 3. Distancia entre los puntos de muestreo

Punto de muestreo	Distancia entre los puntos (m)	
	Sitio contaminado	Sitio sin explotación
1	0	0
2	0.3	1428
3	0.5	1571
4		4000
5		1400

Las submuestras fueron tomadas entre 20 y 30 cm de profundidad (Figura 10), se retiraron los bordes y el centro de la muestra (Figura 11), se colocaron en una bolsa de plástico, luego de obtener cinco submuestras se mezclaron homogéneamente; esa es la muestra compuesta requerida para el análisis (Coraspe & Tejera, 1996).

Figura 10. Hueco en forma de V.

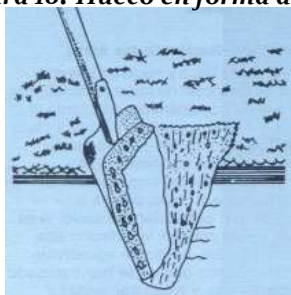
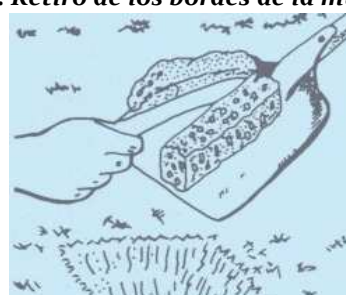


Figura 11. Retiro de los bordes de la muestra.



Fuente: Coraspe, H., & Tejera, S. (Diciembre de 1996). Procedimiento para la toma de muestras en suelos.

3.1.1 Determinaciones fisicoquímicas en campo

En campo es importante la determinación de ciertos parámetros de forma cualitativa, esto con la finalidad de generar una primera aproximación de las características físicas y químicas que posee el suelo (Porta & López-Acevedo Riguerín, 2005). A continuación se resumen los procedimientos utilizados para determinar cualitativamente el contenido de cloruros, sulfatos, arcilla naturalmente dispersa, carbonatos, alcalinidad, materiales alofánicos y/o complejos orgánico-alumínicos, materia orgánica y manganeso; además de la cuantificación de la infiltración (Figuras 12 a 19).

Cloruros

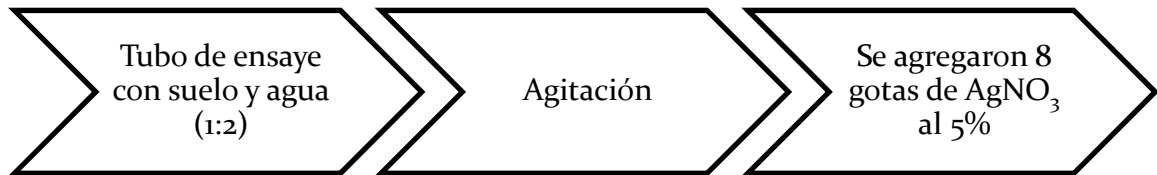


Figura 12. Procedimiento para determinar cloruros

Sulfatos

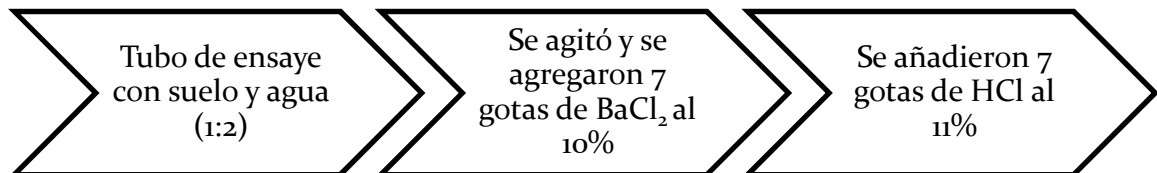


Figura 13. Procedimiento para la determinación de sulfatos

Arcilla naturalmente dispersa

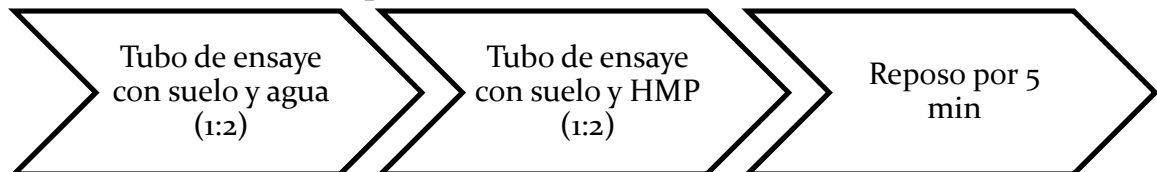


Figura 14. Procedimiento cualitativo para arcilla naturalmente dispersa

Carbonatos

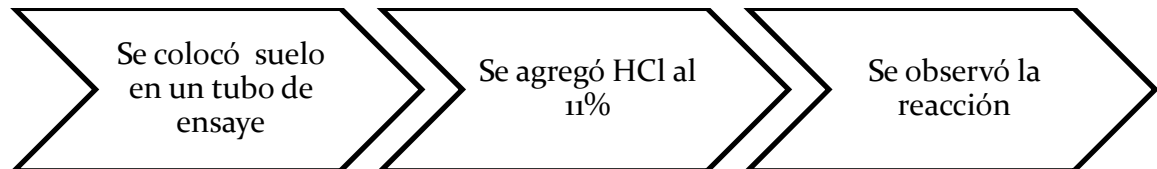


Figura 15. Determinación de carbonatos

Alcalinidad



Figura 16. Procedimiento para la determinación de alcalinidad

Materiales alofánicos y/o complejos orgáno-alumínicos



Figura 17. Procedimiento cualitativo para materiales alofánicos y/o complejos orgáno-alumínicos

Materia orgánica y manganeso

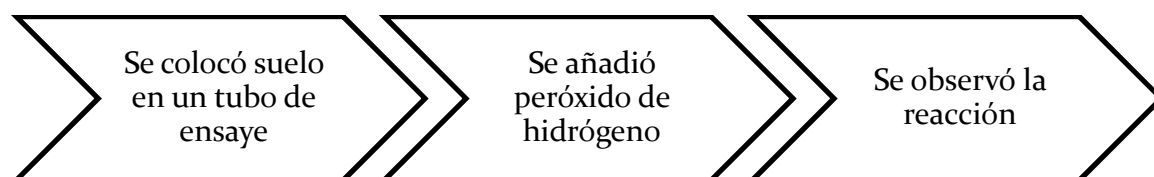


Figura 18. Procedimiento para materia orgánica y manganeso

Infiltración

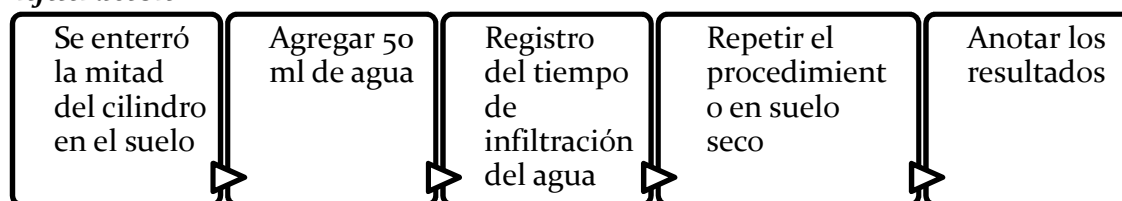


Figura 19. Procedimiento para determinar la infiltración

3.1.2 Preparación de las muestras

La preparación de la muestra de suelo incluye el traslado, recepción, registro, secado, molienda, tamizado, homogeneizado, y el almacenamiento para su conservación; para evitar la contaminación de la muestra de suelo y asegurar mayor precisión y exactitud en el resultado del análisis, se deberá realizar esta operación en un lugar especial y limpio (Figura 20) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

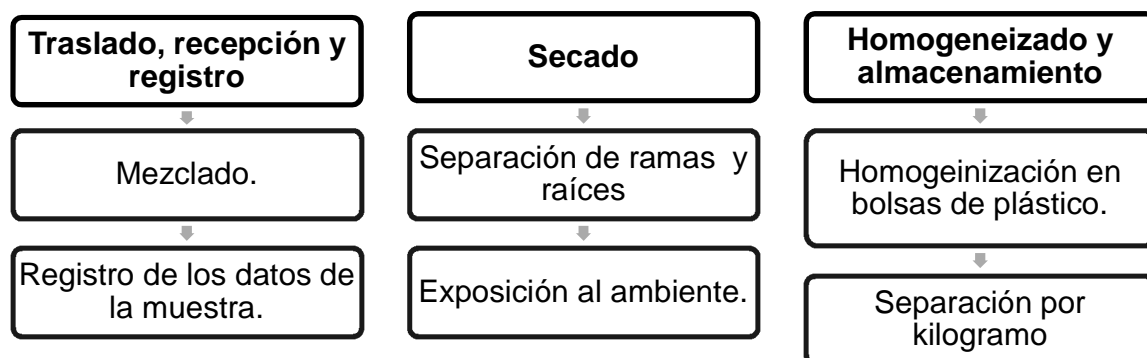


Figura 20. Diagrama de la preparación de las muestras.

3.2 Pruebas microbiológicas

Los métodos clásicos de la detección de microorganismos consiste en disponer las células microbianas viables sobre un medio sólido (cultivo en placa), o en un caldo líquido (procedimientos de enriquecimiento), que contengan la totalidad de los nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos que nos interesan: después, se incuban los cultivos en condiciones que favorezcan el crecimiento de dichos microorganismos, para poder observar sus fenotipos (Atlas & Bartha, 2002).

Las pruebas microbiológicas se realizaron en 3 etapas: Aislamiento de enterobacterias autóctonas, Identificación y caracterización, y, Pruebas de susceptibilidad.

3.2.1 Aislamiento de enterobacterias autóctonas de las muestras

La detección de microorganismos basada en las características fenotípicas requiere que los microorganismos que han de ser detectados específicamente sean recogidos de muestras del ambiente y que sus fenotipos, distintivos y reconocibles, se expresen en cultivo in-vitro (Atlas, Levin, Sandler, & Rogul, 1992).

Diluciones seriadas

En muchos casos se necesita preparar disoluciones con concentraciones extremadamente bajas de un soluto, hasta un punto que es difícil o imposible en la práctica medir la cantidad necesaria de producto sólido o el volumen de solución madre. En esas situaciones es necesario preparar una solución de mayor concentración (solución de stock o solución madre) y hacer diluciones sucesivas a partir de ésta hasta alcanzar la concentración deseada (Universidad de Alcalá, 2014).

Se escogieron tres puntos aleatorios de la muestra contaminada y tres de la muestra sin explotación, de cada uno se tomó 1g de suelo y se agregó a 9 ml de agua destilada y se agitó (solución de stock), se tomaron alícuotas de 100µl (0.1 ml) para la seriación. (Figura 21). Se realizaron dos series de cada punto.

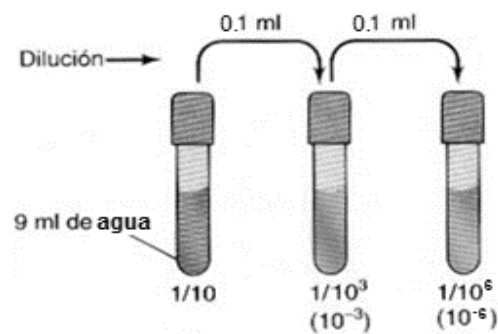


Figura 21. Diluciones seriadas

Siembra en medios diferenciales

Los medios diferenciales no impiden el crecimiento de otros microorganismos, pero permiten la detección de un grupo deseado por diversas características diferenciales (Atlas & Bartha, 2002).

Se prepararon cajas Petri con medio de cultivo MacConkey para obtener el crecimiento de enterobacterias, se sembraron por estría cruzada y se incubaron por 24 horas a 37.5 °C (Britania Lab, 2010). Después de obtener un cultivo axénico bacteriano se sembró en las placas de Agar MacConkey por extensión en placa, se tomó un inóculo y se sembró por estría cruzada en las placas de CLED (Figura 22).



Figura 22. Diagrama de resumen de la metodología

3.2.2 Identificación y caracterización

En el caso de un cultivo axénico bacteriano, es realmente fácil saber cuántos microorganismos contiene. En cambio cuando se manejan comunidades mixtas de muestras ambientales, el problema es mucho más complejo y en la mayoría de los casos, no puede limitarse a una respuesta simple y absoluta (Atlas & Bartha, 2002).

Es necesario recurrir a criterios diferenciales precisos para cuantificar una especie microbiana individual como por ejemplo, la *Escherichia coli*, que se utiliza con frecuencia como indicador de contaminación fecal (Atlas & Bartha, 2002).

Pruebas bioquímicas

Los organismos varían en su capacidad para utilizar diferentes compuestos (por ejemplo: carbohidratos, urea, citrato, etc.) para algunos microorganismos que se usan en su identificación en el laboratorio (L., 2009).

Después de preparar los medios de cultivo para pruebas bioquímicas (TSI, LIA, MIO, citrato y urea) se tomaron los inóculos de las colonias aisladas en placa, se sembraron como se explica en la Figura 23, y se incubaron por 24 horas a 37.5 °C; se consultó bibliografía con los resultados obtenidos para la identificación de las cepas aisladas.

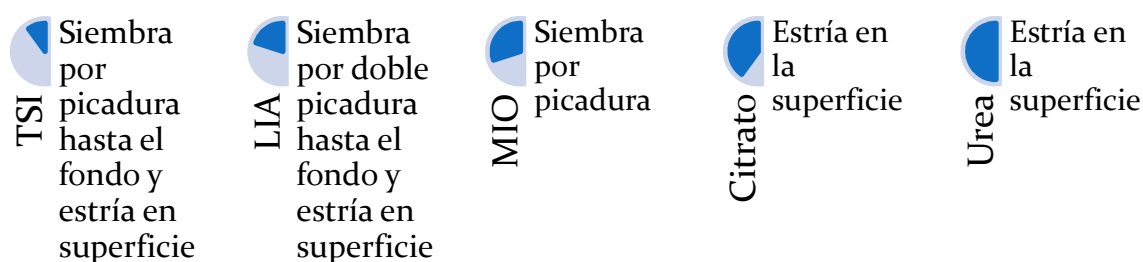


Figura 23. Método de siembra de las pruebas

Siembra en medios selectivos

Los medios diseñados para inhibir el crecimiento de un grupo de microorganismos mientras que permite el crecimiento de otro grupo se conoce como medio selectivo (Atlas & Bartha, 2002). Se sembró en Agar Cetriamida y Soya Trypticaseína con el fin de corroborar la identificación obtenida mediante las pruebas bioquímicas.

Pruebas de la oxidasa

Esta prueba está basada en la identificación de una enzima bacteriana llamada citocromoC oxidasa, para reducir el nombre se le dice oxidasa. Se utilizan colorantes cromógenos que actúan como aceptadores artificiales de electrones que sustituyen de cierta manera al oxígeno usado por la bacteria (Ruiz, 2011).

Sobre un portaobjetos se adhirió con una gota de agua destilada un disco impregnado con citocromo oxidasa y se añadió una unidad formadora de colonias (UFC) con un asa microbiológica y se observó si había un cambio de coloración (Figura 24).

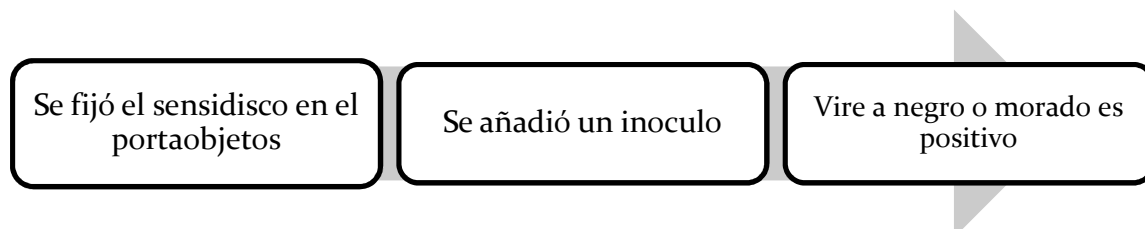


Figura 24. Resumen de la metodología de la prueba de la oxidasa

Pruebas de catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, el desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva (Universidad de Granada, 2016).

Se colocó una gota de peróxido de hidrogeno al 30% en un portaobjetos y con un palillo plano se tomó un inóculo a partir de una colonia aislada (Figura 25), si se observa un burbujeo significa que hay producción de oxígeno (Ruiz, 2011).

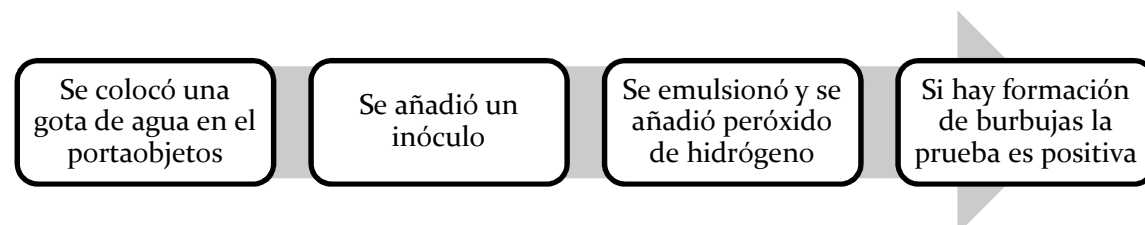


Figura 25. Resumen del procedimiento de la prueba de catalasa

Tinción de GRAM

Además de las características físicas de las bacterias se correlaciona con otras propiedades como endotoxinas, susceptibilidad a antibióticos, sensibilidad o resistencia a sales biliares, punto isoeléctrico y tensión superficial (Rodríguez, Gamboa, Hernández, & García, 2005). En la Figura 26 se resume el procedimiento a seguir.

➤ **Frotis bacteriano**

1. En un portaobjetos se colocó una gota de agua destilada.
2. Con el asa microbiológica se tomó un inóculo del cultivo en placa y se hizo una emulsión
3. Se secó a temperatura ambiente o manteniendo el portaobjetos cerca del mechero de bunsen, a una distancia en la que el calor no afecte al inóculo.

➤ **Tinción**

1. El portaobjetos con la muestra seca se cubrió con 2 o 3 gotas de cristal violeta durante un minuto.
2. Se añadió lugol suficiente para cubrir e frotis durante un minuto.
3. Se enjuagó con agua de la llave y se agregó una o dos gotas de alcohol-cetona, se volvió a enjuagar después de 9 segundos.
4. Por último, se cubrió el frotis con safranina y se enjugó después de 1 minuto.
5. Se dejó secar a temperatura ambiente
6. Se observó en un microscopio óptico con un objetivo 100X usando aceite de inmersión.

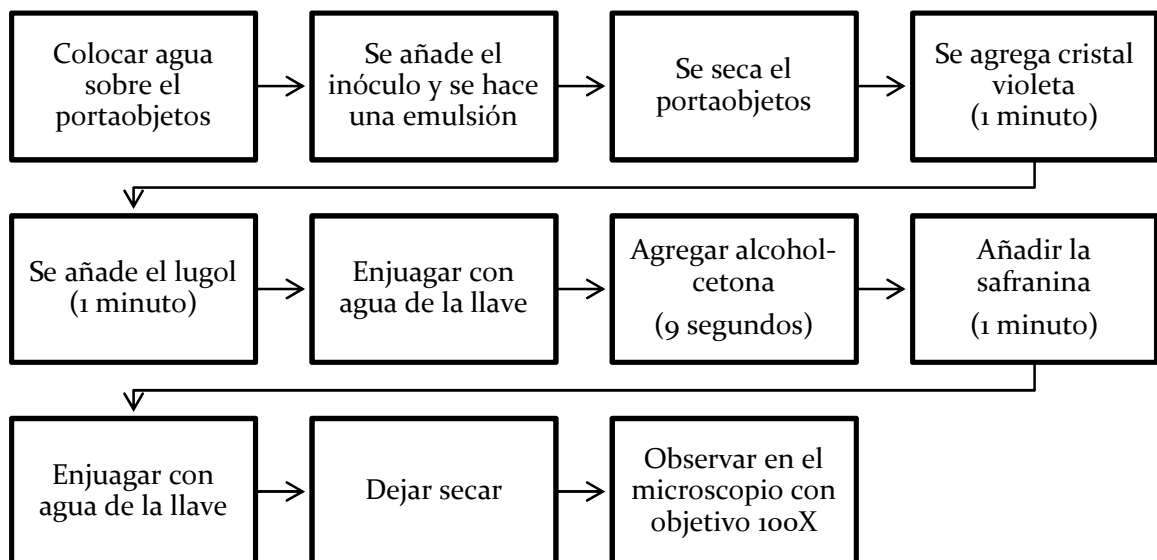


Figura 26. Diagrama de procedimiento de la Tinción de Gram

3.2.3 Pruebas de susceptibilidad

Este método incorpora la sustancia a discos de papel de filtro, permite agilizar la determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a un número importante de antimicrobianos de forma simultánea. El empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad está estandarizado y se correlaciona con la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) (García, García, & Fresnadillo, 2010).

1. Cortar papel filtro en círculos pequeños e introducirlos en los vasos de precipitado con las soluciones, se toma uno por concentración para cada caja.
2. Colocar los sensidiscos en las paredes de los vasos para eliminar el excedente de la solución.
3. En la superficie de las placas de agar inoculadas se colocarán los discos correspondientes a las soluciones. Se incubarán a 37° C durante 24 horas y se estudia el crecimiento en ellas (Picazo, 2000).

Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y de esta manera se sabe si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente (García, García, & Fresnadillo, 2010). (Tabla 4).

Tabla 4. Valoración de los halos de inhibición

Halo		Clasificación del microorganismo
Presente	Gran diámetro	Sensible
	Existencia del halo	Intermedio
Ausente		Resistente

Este procedimiento se realizó de forma preliminar en las placas de Agar MacConkey y con Agar Mueller Hinton (Figura 27).



Figura 27. Diagrama de resumen de la metodología

3.3 Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo contaminadas artificialmente

Un suelo contaminado es una porción delimitada de terreno superficial o subterráneo, donde las cualidades originales han sido modificadas por la acción humana, produciendo una contaminación química por adición de elementos o compuestos en concentraciones que alteren la composición originaria del suelo. El criterio para poder establecer el umbral máximo de concentración o cantidad permitida para cualquiera de los posibles contaminantes de los suelos, está relacionado con su capacidad para alterar o degradar la calidad del mismo; en el suelo el contaminante es, en principio, poco móvil (Ruda de Schenquer, Mongiello, & Acosta, 2004).

Los estudios de caracterización de suelos se plantean en etapas secuenciales que permitan avanzar en el conocimiento de las áreas afectadas, en el caso de detectarse parámetros contaminantes en el subsuelo (Galán, Moreno, & Torra, 2009).

Se realizaron análisis de caracterización de suelos utilizando seis muestras de un terreno sin explotación previa, una como patrón y cinco contaminadas artificialmente con soluciones saturadas en concentraciones de 16.00, 32.03, 48.04, 64.01 y 80.14 g/l de un detergente aniónico comercial de lavandería para realizar una caracterización fisicoquímica con la finalidad de monitorear el cambio en sus propiedades.

La determinación de color con las tablas de Munsell y de la textura del suelo con el método del hidrómetro de Bouyoucus establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, y la Estabilidad de los agregados con el método de Yoder, se realizaron únicamente en la muestra del terreno sin explotación previa utilizada como patrón. En las seis muestras, se realizaron los siguientes análisis con fines comparativos.

- Determinación de humedad por gravimetría
- pH y Conductividad Eléctrica medidos en agua

- Densidad aparente
- Densidad real
- Porosidad
- Contenido de materia orgánica con el método de Walkley y Black
- Determinación de nitrógeno total

A continuación se describe brevemente la importancia de estos análisis y se explican los procedimientos implementados.

Contaminación artificial de las muestras

Se definirá si el emplazamiento presenta o no indicios de afección en el suelo, con una valoración general de la contaminación y su peligrosidad (Galán, Moreno, & Torra, 2009). El procedimiento que se realizó se muestra en la figura 28.

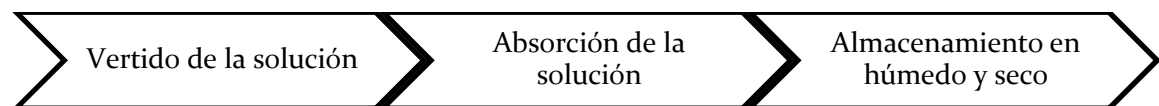


Figura 28. Resumen del procedimiento en la contaminación artificial de la

Determinación de humedad por gravimetría

El contenido de humedad de una masa de suelo, está formado por la suma de sus aguas libre, capilar e higroscópica (Universidad Católica de Valparaíso, 2005). El método (Figura 29) se basa en la medición o determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que tiene una muestra de suelo; se realiza por la diferencia en peso entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

1. Los botes de aluminio se introdujeron tapados en la estufa durante 24 horas a una temperatura de 105°C, se registró el peso hasta que fue constante.
2. Utilizando las pinzas, se llevaron al desecador hasta que se enfriaron y se registró el peso.
3. Se colocaron 30 gramos de la muestra y se registró el peso, se destapó y se introdujo en la estufa a 105°C por 24 horas.

4. Después se tapó, se colocó en el desecador y se pesó. Se colocó en la estufa durante una hora y se enfrió en el desecador hasta alcanzar el peso constante.

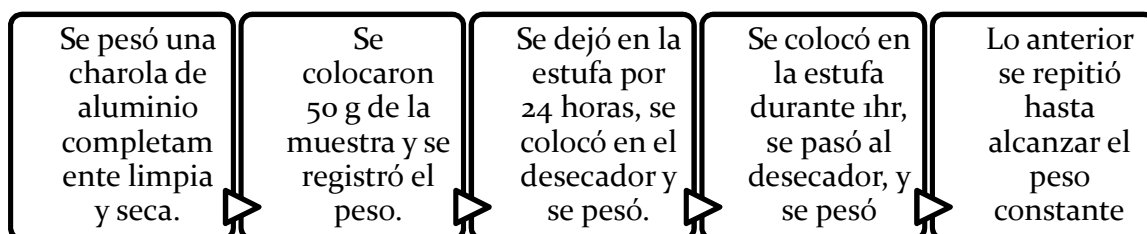


Figura 29. Procedimiento para la determinación de humedad

Preparación de las muestras

Para la preparación de la muestra se realizó el procedimiento descrito en el punto 2.1.2, después de exponer las muestras al ambiente se muelen, tamizan y almacenan (Figura 30).

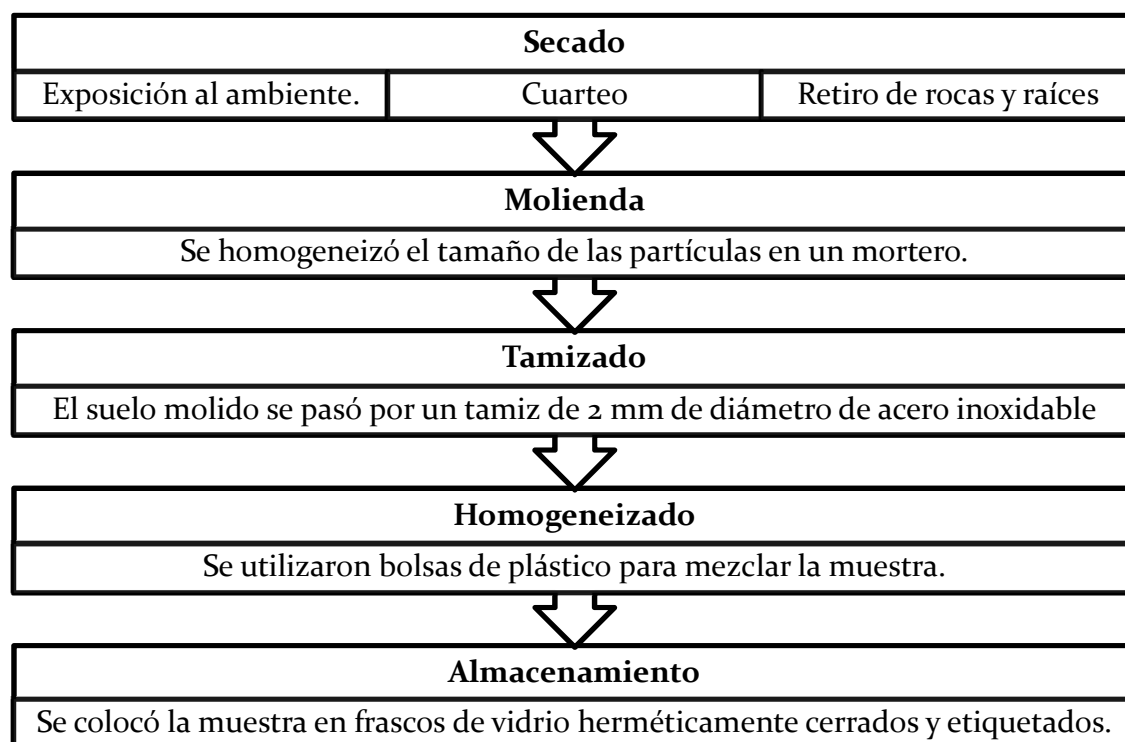


Figura 30. Procedimiento en la preparación de las muestras para los análisis

Determinación de color con las Tablas de Munsell

El método de la Tabla Munsell (Figura 31) para la determinación de color de los suelos minerales y orgánicos se basa en el igualamiento del color observado en el suelo tanto en seco como en húmedo respecto al color registrado en las tarjetas de color, donde se manejan los parámetros de matiz (Hue), brillo (Value) e intensidad (Chroma) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

➤ **Determinación en seco**

1. Se tomó una pequeña cantidad de la muestra preparada, lo suficiente para enrasar uno de los huecos de la placa de porcelana.
2. Se colocó la cápsula de porcelana debajo de la página de la tabla Munsell, ubicando la muestra de suelo por debajo de cada orificio de la carta.
3. Se recorrieron las páginas consideradas con mayor similitud al color observado hasta encontrar el más parecido.
4. Una vez ubicado, se registraron los valores del Hue, Value y Chroma correspondientes.

➤ **Determinación en húmedo**

Se sigue el procedimiento anterior con la diferencia de que una vez colocado el suelo en la placa de porcelana se humedece sin saturarlo, teniendo cuidado de no exceder el agua, para evitar que brille.

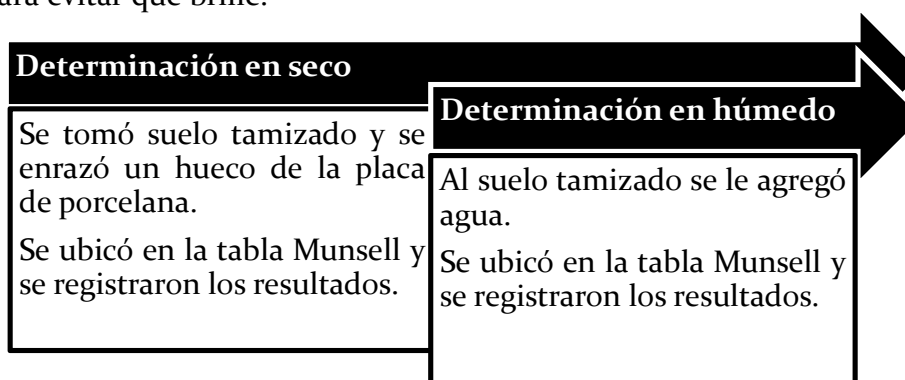


Figura 31. Resumen de la metodología en la determinación de color

Estabilidad de los agregados con el método de Yoder

Un agregado es un grupo primario de partículas que se adhieren más fuerte entre ellas que a otras partículas que rodean al suelo (Soil Science Society of America, 2015). La estabilidad de agregados está en función de que las fuerzas de cohesión entre las partículas puedan soportar aplicación de la fuerza de ruptura (Burt, 2014). Este método evalúa la estabilidad estructural de los suelos mediante el tamizado en húmedo con el cual se determina el porcentaje de agregados estables al agua, al someter muestras de agregados, secos al aire, a movimientos ascendentes y descendentes a agitación (Lobo & Pulido, 2013). El procedimiento (Figura 32) consiste en:

1. Se colocaron 50g de suelo seco en un tamiz y se agregó agua destilada
2. Se llenó el recipiente con agua y se introdujo el tamiz con la muestra, la superficie del agua estuvo aproximadamente 5cm por encima de la muestra de suelo
3. Se hicieron oscilaciones a los largo de una distancia vertical de 1.5cm (30 oscilaciones por minuto) durante 3 minutos.
4. Al terminar se vació el tamiz en un vaso de precipitado de 200ml y se colocó en la estufa a 105°C hasta que el suelo se secó.
5. Se retiró el vaso de la estufa y se dejó enfriar en el desecador. Después se registró su peso. (Burt, 2014)

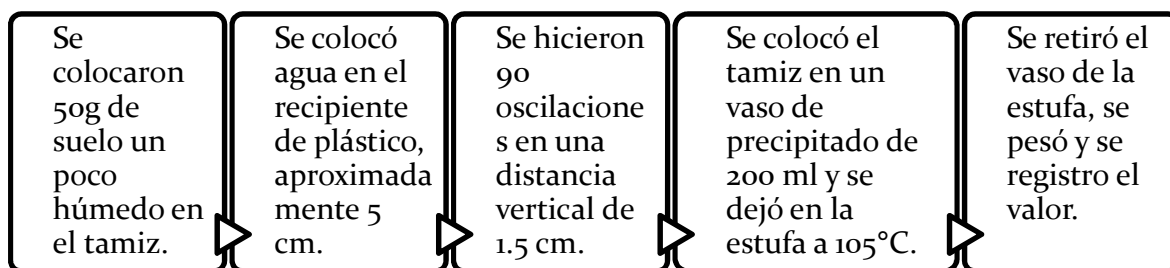


Figura 32. Procedimiento del método de Yoder

pH y Conductividad Eléctrica medidos en agua

Son métodos electrométricos basados en la determinación de la actividad del ión H⁺ en el caso del pH y en el contenido de sales para la CE (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002); ambos procedimientos se resumen en la Figura 33.

➤ **pH**

La concentración de iones hidrógeno es una propiedad importante cuando se estudia un suelo ya que controla muchas de las actividades químicas y biológicas que ocurren en él y tiene una influencia indirecta en la disponibilidad de ciertos elementos nutritivos para las plantas (Universidad de Chile, 2016).

➤ **Conductividad eléctrica**

El análisis de la CE en suelos se hace para establecer si las sales solubles se encuentran en cantidades suficientes como para afectar la germinación normal de las semillas, el crecimiento de las plantas o la absorción de agua por parte de las mismas (Universidad de Chile, 2016).

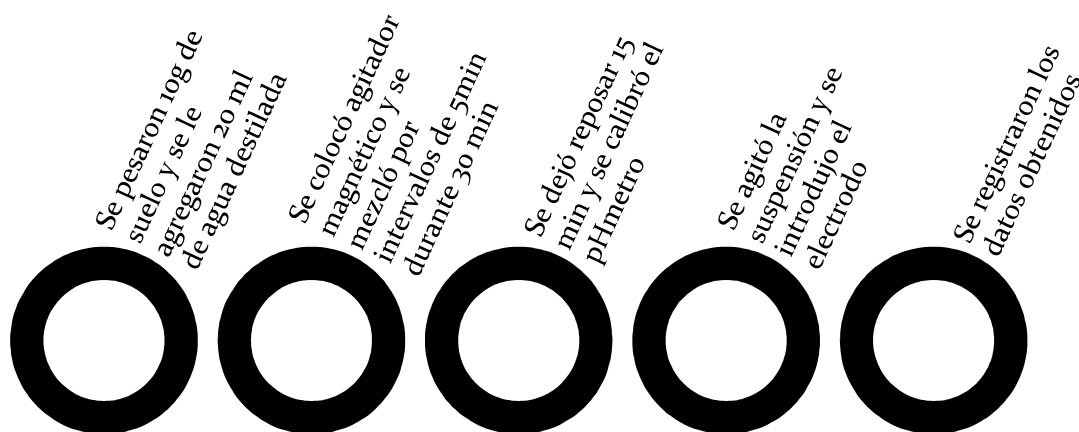


Figura 33. Procedimiento del método electrométrico para medir pH y CE

Densidad aparente con el método de la probeta

La densidad aparente se define como la masa de suelo por unidad de volumen (g/cm^3 o Kg/m^3). Describe la compactación del suelo, representando la relación entre sólidos y espacio poroso (Keller & Håkansson, 2010). La densidad aparente varía con la textura del suelo y el contenido de materia orgánica; puede variar estacionalmente por efecto de labranzas y con la humedad del suelo sobre todo en los suelos con arcillas expansivas (Taboada & R., 2008).

El cálculo de la densidad aparente exige conocer la fracción de peso y volumen de suelo que corresponde a la tierra fina, lo que exige determinar el volumen ocupado por las fracciones minerales y orgánicas gruesas, y el peso de cada una de ellas, determinando los correspondientes a la tierra fina por diferencia (Rubio, 2010). El procedimiento se presenta en la siguiente figura (Figura 34).

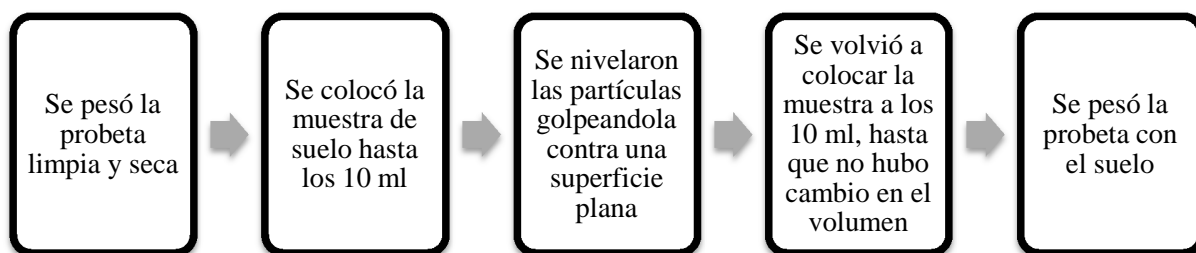


Figura 34. Procedimiento para la determinación de densidad aparente.

Densidad real. Método del picnómetro

La densidad real, de las partículas densas del suelo, varía con la proporción de elementos constituyendo el suelo y en general está alrededor de 2,65 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2016).

Este procedimiento (Figura 35) permite el cálculo de la densidad de cualquier líquido a través de tres determinaciones gravimétricas (a través de la determinación de tres masas con una balanza analítica). Se requiere conocer la temperatura con la que se realiza la prueba ya que es necesario aplicar un factor de corrección (Huerta, 2010).

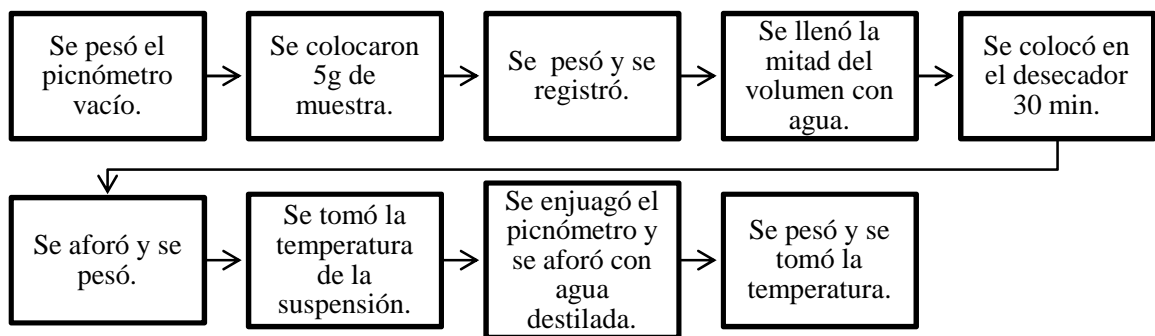


Figura 35. Procedimiento para la determinación de densidad real.

Porosidad

El espacio poroso del suelo se refiere al porcentaje del volumen del suelo no ocupado por sólidos, mediante la determinación de la densidad se puede obtener la porosidad total del suelo. Se refiere al peso por volumen del suelo (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2016).

La porosidad como una propiedad física se refiere a las cavidades o poros que permiten la penetración de agua y aire en el suelo. Se relaciona directamente con el contenido de materia orgánica. Por ejemplo, en un suelo arenoso el agua y el aire ingresan con facilidad, por lo que se dice que es de baja porosidad. Se calcula mediante la razón matemática de la densidad real y la aparente.

Determinación de textura por el método de Bouyoucos

La textura indica el contenido relativo de partículas de diferente tamaño, como la arena, el limo y la arcilla, en el suelo; tiene que ver con la facilidad con que se pueda trabajar el suelo, la cantidad de agua y aire que retiene y la velocidad con que el agua penetra el suelo y lo atraviesa (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2006).

Este método se elimina la agregación debida a la materia orgánica y la floculación por los cationes de calcio y magnesio, no se eliminan otros cementantes como los carbonatos. El tiempo de lectura se ha escogido de 40 segundos para la separación de

partículas mayores de 0.05 mm (arena) y de 2 horas para partículas de diámetro mayores de 0.002 mm (limo y arena). Estos límites han sido establecidos por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos y se han usado para construir el triángulo de texturas (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

El procedimiento se realiza en dos partes ya que es necesaria la degradación de materia orgánica de la muestra (Figura 36) para realizar la determinación de la textura (Figura 37).

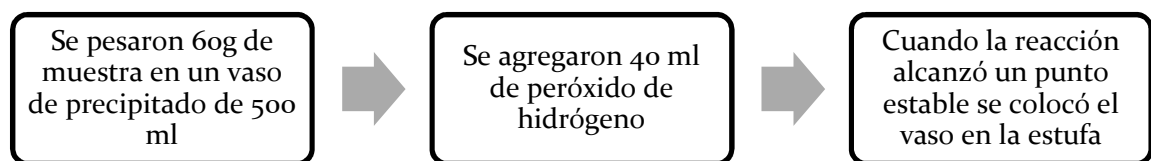


Figura 36. Proceso de degradación de la materia orgánica de la muestra.

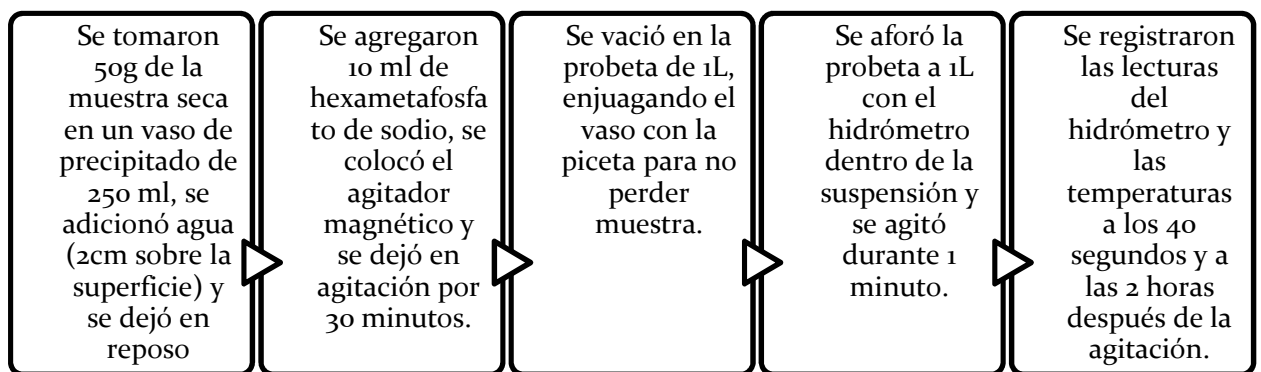


Figura 37. Procedimiento después de degradar la materia orgánica de la muestra.

Contenido de materia orgánica con el método de Walkley y Black

La biota del suelo usa los residuos de las plantas y los animales y los derivados de la materia orgánica como alimentos, a medida que estos se descomponen, los nutrientes en exceso (N, P y S) son liberados dentro del suelo en forma que puedan ser usados por las plantas. Los productos de deshecho producidos por los microorganismos contribuyen a la formación de la materia orgánica del suelo (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2015).

La determinación de materia orgánica del suelo se evalúa a través del contenido de carbono orgánico, el método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado (Figura 38). Después de diluir la mezcla, se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias de Fe^{3+} y el dicromato de potasio residual es valorado con sulfato ferroso. Con este procedimiento se detecta entre un 70 y 84% del carbón orgánico total por lo que es necesario introducir un factor de corrección (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

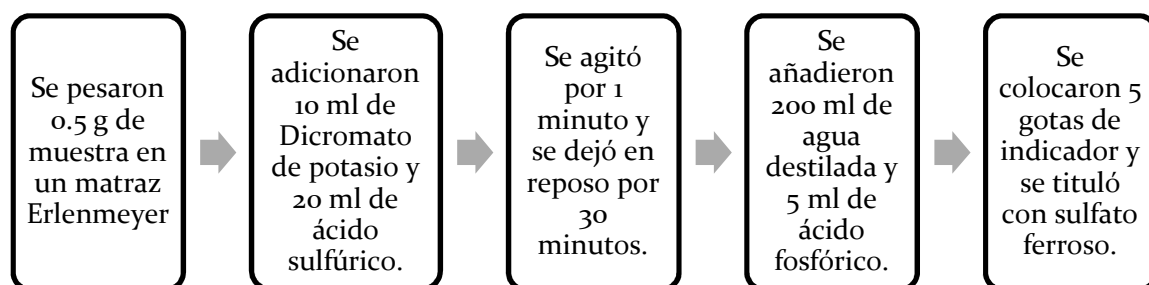


Figura 38. Procedimiento en la determinación de materia orgánica

Determinación de nitrógeno total

El nitrógeno puede llegar al suelo gracias a los aportes de materia orgánica y a la fijación bacteriana a partir del aire. Dentro del suelo es aprovechado por las plantas, animales y microorganismos que lo incorporan a sus tejidos. Cuando dichos organismos se mueren, el nitrógeno reingresa al suelo completando el ciclo (Instituto Nacional de Ecología, 2007). La determinación de nitrógeno total se realiza con el método Micro-Kjeldahl (Modificado por Bremner, 1965). El método Kjeldahl comprende tres fases fundamentales (Figura 39):

➤ **Digestión de la muestra**

La muestra de suelo se somete a una digestión por calentamiento con ácido sulfúrico y por una mezcla de sales que aceleran y facilitan tanto la oxidación de la materia orgánica como la conversión de todas las formas de nitrógeno en N^{+3} , que en medio ácido se encuentran en forma de radical amonio (NH_4^+); es decir, se llevan las formas orgánicas a formas minerales de nitrógeno.

➤ **Destilación**

Una vez transformado el nitrógeno en NH_4^+ , se expone a una base fuerte como el hidróxido de sodio para formar hidróxido de amonio, que por la acción del calor se descompone en amoniaco (NH_3) y agua

➤ **Valoración**

El amoniaco desprendido por la reacción se recoge en un volumen conocido de solución valorada de ácido bórico y por comparación con un blanco se determina la cantidad de ácido que reaccionó con el NH_3 .

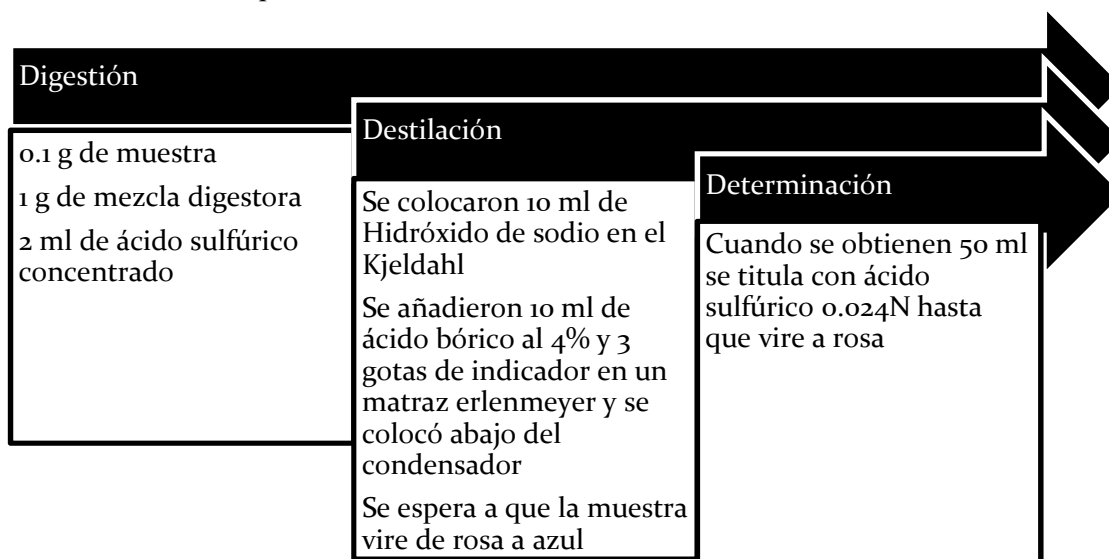


Figura 39. Procedimiento del método Micro-Kjeldahl modificado por Bremner

3.4 Aplicación de las enterobacterias degradadoras en el suelo

La degradación de compuestos orgánicos en ambientes naturales esta mediado, principalmente, por dos grupos: bacterias y hongos. Las bacterias representan el grupo con mayor diversidad, encontrándose en todos los ambientes; sus características de crecimiento y metabolismo rápido, plasticidad genética y su alta capacidad de adaptación a una gran variedad de condiciones hacen que sea el grupo más utilizado en los procesos de biorremediación (Hernández-Acosta, Ferrera-Cerrato, & Rodríguez, 2003).

3.4.1 Análisis de biotratabilidad

En algunos casos, los microorganismos están presentes en poblaciones pequeñas para realizar una degradación exitosa, o en condiciones no convenientes para su proliferación ni actividad, por lo que puede ser necesario seleccionar y aclimatar un consorcio apropiado por la manipulación de condiciones para aumentar su proliferación (Metting, 1993). El análisis se realizó mediante el monitoreo con un densitómetro del crecimiento bacteriano en un inóculo líquido al añadir soluciones saturadas de las diferentes concentraciones del detergente aniónico (Figura 40).

El principio de funcionamiento de un densitómetro se basa en la medición de la densidad óptica con la presentación digital de los resultados en unidades McFarland. Sirve para medir la concentración celular (células de levadura y bacterianas) durante el proceso de fermentación, la determinación de la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos, para la medición de la absorción en la longitud de onda definida, así como la valoración cuantitativa de la concentración de solución colorante, absorbiendo luz verde (Biosan: Medical-Biological Research & Technologies, 2017).



Figura 40. Prueba de biotratabilidad

3.4.2 Inoculación y monitoreo por espectrofotometría UV-Vis

La siembra de bacterias degradadoras se denomina como bioaumento ya que amplía la capacidad metabólica de las poblaciones microbianas autóctonas; comprende la introducción de microorganismos en el ambiente para aumentar la velocidad, la extensión, o ambas, de la biodegradación. La lógica de este método es que las poblaciones microbianas autóctonas puede que no tengan capacidad de degradar

xenobióticos o la amplia gama de sustratos potenciales presentes en mezclas complejas de contaminantes (Atlas & Bartha, 2002).

Para evaluar el porcentaje de degradación en el suelo, se utilizaron inóculos líquidos sin nutrientes añadidos con las muestras de suelo contaminadas artificialmente, se realizaron monitoreos por espectrometría en la región UV-Visible a una longitud de onda de 450 nm con un blanco de 5 µg del detergente y soluciones de 5 µg de suelo inoculado (Figura 41).

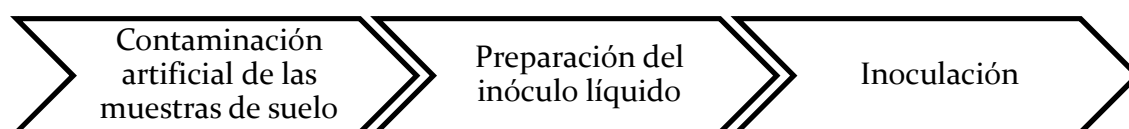


Figura 41. Resumen del procedimiento de inoculación

3.5 Conservación de cepas

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas (García & Uruburu, 2016). La conservación se realizó en tubos eppendorf con la congelación de inóculos líquidos con glicerol como agente crioprotector (Figura 42).

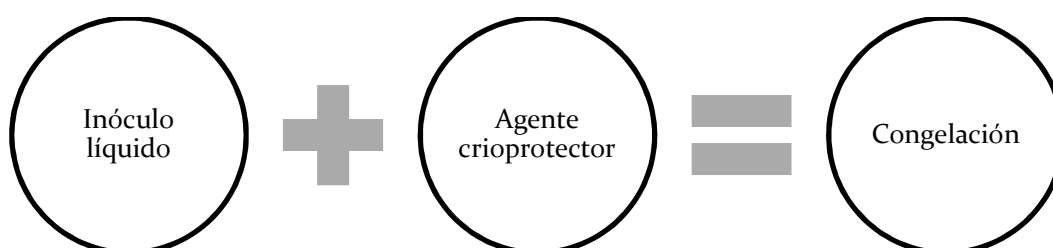


Figura 42. Metodología en la conservación de cepas

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Toma de muestra

La toma de muestra se realizó como se establece en el punto 2.1, una vez terminado el muestreo (Figura 43) las submuestras se mezclaron homogéneamente, se realizaron las determinaciones fisicoquímicas en campo, y se colocaron en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio.



Figura 43. Técnica de muestreo en el sitio sin explotación

4.1.1 Determinaciones fisicoquímicas en campo

En el muestreo se observó un horizonte de gran espesor y superficie oscura, relacionado a un gran contenido de materia orgánica, conocido como epipedón mólico; los resultados obtenidos en las pruebas de campo (Tabla 5) permitieron suponer que se trataba de un suelo de orden Molisol.

Los molisoles son suelos superficiales a moderadamente profundos, con epipedón mólico, desarrollados de materiales volcánicos y sedimentarios; tienen horizontes superficiales oscurecidos, estructurados en gránulos bien desarrollados de consistencia firme y con un gran contenido de bases, principalmente Ca y Mg (Departamento de agronomía de los Estados Unidos, 1995).

Tabla 5. Resultados de las determinaciones en la muestra que se utilizará en el análisis

Determinación		Resultado
Cloruros		Negativo
Sulfatos		Positivo
Arcilla naturalmente dispersa	Agua	Positivo
	HMP	Negativo
Carbonatos		Negativo
Alcalinidad		Negativo
Materiales alofánicos y/o complejos orgáno-aluminicos		Positivo
Materia orgánica		Positivo
Manganeso		Positivo
Infiltración (ml/min)		0.1388

4.1.2 Preparación de las muestras

Después de trasladar las muestras al laboratorio, se retiraron las raíces y se pesaron en una balanza granataria, registrando 600 g de la muestra contaminada y 9.615 Kg del sitio sin explotación (Figura 44); la muestra del sitio sin explotación se almacenó en 5 bolsas diferentes para facilitar su manejo.



Figura 44. Traslado y almacenamiento de las muestras

4.2 Pruebas microbiológicas

El suelo es un ecosistema con una gran variedad de poblaciones microbianas de diferentes tipos fisiológicos; las características químicas, físicas y biológicas de un suelo particular influirán en el número y actividades de sus diversos componentes microbianos (Instituto Nacional de Ecología, 2004).

4.2.1 Aislamiento de enterobacterias autóctonas de las muestras

Se realizaron las diluciones seriadas como se describió en el punto 2.2.1, se tomó un inóculo de cada una, con una repetición con la dilución 1:10, y se sembró por estría cruzada en placas de agar MacConkey como primer aislamiento. (Tabla 6).

Tabla 6. Diferenciación de cultivos y conteo de colonias.

Muestra		Cultivo	Número de colonias
Contaminada por limpiadores		A	111
		B	76
		C	51
No contaminada	Húmeda de campo Expuesta al ambiente	D	50
		E	101
		F	219

Se sembró por estría cruzada hasta obtener los cultivos axénicos (Figura 45), posteriormente, se sembró por extensión en placa para su identificación y caracterización.

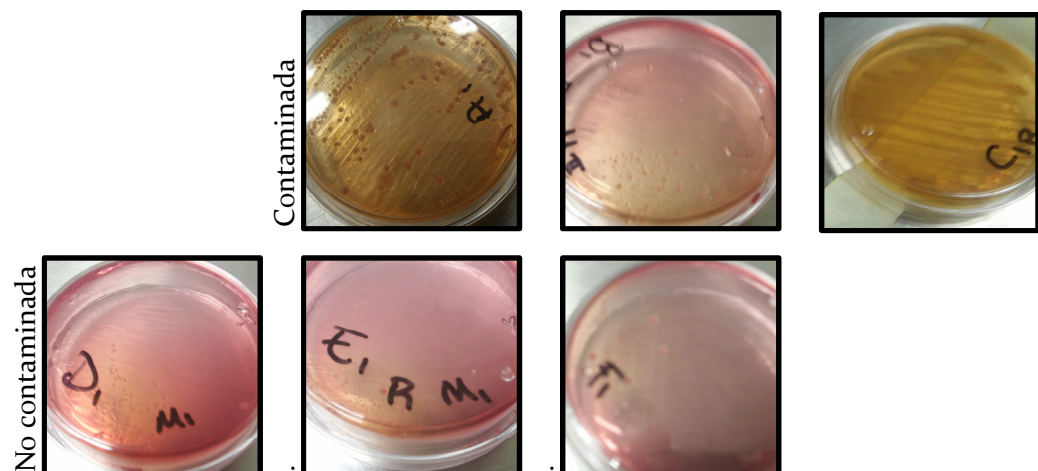


Figura 45. Cultivos axénicos bacterianos

4.2.2 Identificación y caracterización

A partir de los cultivos axénicos se tomó un inóculo para realizar las pruebas bioquímicas, después del periodo de incubación se observó lo siguiente (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Resultados registrados en las pruebas bioquímicas

Prueba bioquímica Cepa	TSI	LIA	M	I	O	Citrato	Urea	Oxidasa	Catalasa
<i>Serratia marcescens</i>	A/K	K/K	+	-	+	+	-	-	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	K/NC	K/K	+	+	+	+	-	+	+

Donde: M = Movilidad, I = Indol, O = Ornitina, A = Ácido, K = Alcalino, NC= Sin cambio

Tabla 8. Observaciones de los resultados de las pruebas bioquímicas

Prueba bioquímica	Observaciones de los cultivos bacterianos
TSI	No hay fermentación de glucosa
LIA	Descarboxilan la lisina, no hay desaminación
MIO	Tienen movilidad, C posee la enzima triptofanasa
Citrato	Utilizan las sales de amonio como fuente de carbono

Mediante la comparación de los resultados con la bibliografía se realizó la identificación de género y especie de los cultivos bacterianos. En un estudio previo, con las mismas cepas, se demostró su potencial de degradación con una solución de surfactante LAS (Hidalgo & Ortiz, 2016); estos resultados se muestran junto a la identificación de las cepas en la Tabla 9.

Tabla 9. Enterobacterias identificadas

Muestra	Enterobacteria	Degradación
A	<i>Serratia marcescens</i>	Alta
B	<i>Morganella morgani</i>	Muy baja
C	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Alta
D	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nula
E	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Muy baja
F	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Muy baja

Los análisis se realizaron con la cepa de *Serratia marcescens*, se tomaron dos inóculos del cultivo axénico y se identificaron como “A” y “B”, y para fines comparativos, *Pseudomona aeruginosa* (Figura 46). Ambas son potencialmente patógenas y forman parte de la microbiota natural del suelo (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994).

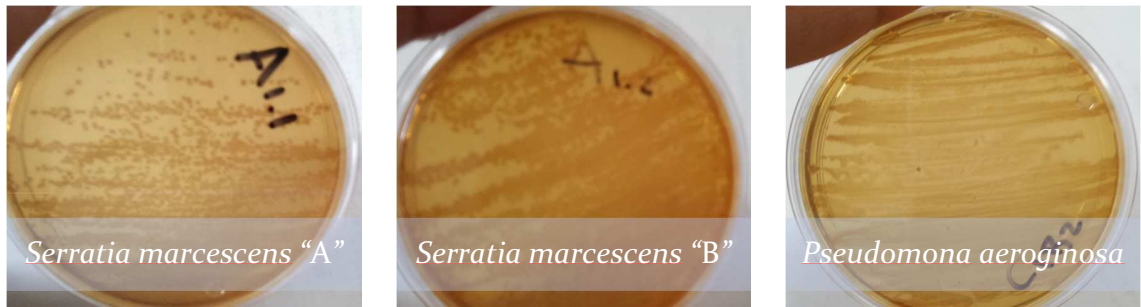


Figura 46. Cultivos axénicos de *Serratia marcescens* "A", *Serratia marcescens* "B" y *Pseudomonas aeruginosa*.

Posteriormente, se inoculó en placas de CLED para realizar una diferenciación y observar su comportamiento al cambiar las condiciones de crecimiento, como la temperatura y las fuentes de carbono (Figura 47).



Figura 47. Cultivos axénicos en agar CLED

Posteriormente se corroboró la identificación de las cepas mediante la observación del crecimiento en Agar Cetrimida para *Pseudomonas aeruginosa* y la presencia de prodigiosina (pigmento rojo-naranja) en Agar Soya Trypticaseína para *Serratia marcescens* (Figura 48).



Figura 48. Cepas de *serratia marcescens* y *pseudomonas aeruginosa* en agar soya tripticaseína y cetrimida respectivamente

Los resultados de las pruebas de la oxidasa fueron positivo (*Pseudomona aeruginosa*) y negativo (*Serratia marcescens*); en el caso de catalasa, resultaron ambas positivas. Al realizar la tinción de GRAM se volvió a comprobar que se trataba de bacilos GRAM negativos.

4.2.3 Pruebas de susceptibilidad

Se sembró con tres extensiones en placa en Agar Mueller Hinton y se dejó incubar por 48 horas; se colocaron los sendiscos en las soluciones del detergente con concentraciones de 16.00, 32.03, 48.04, 64.01 y 80.14 ppm y se dejaron reposar durante 24 horas. Una vez listos los cultivos se colocaron los sensidiscos en las placas, a las 72 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados (Tablas 10, 11 y 12).

- *Serratia marcescens* “A”

Tabla 10. Resultados de las pruebas de sensibilidad de *Serratia marcescens* “A”

Concentración (ppm)	16.00	32.03	48.04	64.01	80.14
Diámetro del halo (mm)	0	0	0	1	2
Valoración del microorganismo	R	R	R	I	I

Donde: R = resistente, I = intermedio y S = sensible.

- *Serratia marcescens* “B”

Tabla 11. Resultados de las pruebas de sensibilidad de *Serratia marcescens* “B”

Concentración (ppm)	16.00	32.03	48.04	64.01	80.14
Diámetro del halo (mm)	0	0	0.5	1	2
Valoración del microorganismo	R	R	I	I	I

Donde: R = resistente, I = intermedio y S = sensible.

- *Pseudomona aeruginosa*

Tabla 12. Resultados de las pruebas de sensibilidad de *Pseudomona aeruginosa*

Concentración (ppm)	16.00	32.03	48.04	64.01	80.14
Diámetro del halo (mm)	0	0	0	0	0
Valoración del microorganismo	R	R	R	R	R

Donde: R = resistente, I = intermedio y S = sensible.

Al comparar los resultados obtenidos se observó que el potencial de degradación de *Serratia marcescens* "A" es muy alto al ser resistente a tres de las cinco concentraciones de detergente evaluadas; mientras que el de *Serratia marcescens* "B" se puede considerar como alto, ya que es resistente a dos concentraciones del detergente.

En ambos casos, en las siguientes concentraciones, se presentaron halos de inhibición muy pequeños, que pueden valorarse como indicativos de resistencia intermedia pero también pueden considerarse como concentraciones potenciales para ser degradadas por estos microorganismos (Figura 49). Los resultados de *Pseudomona aeruginosa* se utilizaron como referencia para evaluar a *Serratia marcescens*, ya que se sabe que es un microorganismo sumamente adaptable que puede usar más de 80 compuestos orgánicos para la proliferación (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994).



Figura 49. Resultados de la pruebas de sensibilidad después de 72hrs.

4.3 Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo contaminadas artificialmente

Se realizó la contaminación artificial con el vertido de las cinco soluciones saturadas (16.00 ppm, 32.03 ppm, 48.04 ppm, 64.01 ppm y 80.14 ppm) del detergente en cinco recipientes de vidrio con 300g de la muestra de suelo sin explotación previa; se dejó expuesto al ambiente hasta que la solución se absorbió completamente; al verter las soluciones se observó un desplazamiento del aire en las muestras, y después de dejarlas expuestas al ambiente se notó un cambio en la porosidad de las muestras (Figura 50).

Para facilitar la diferenciación de las muestras, se enumeraron de acuerdo a sus concentraciones de detergente del cero al cinco, donde el cero es el suelo sin contaminar y cinco es la muestra con la concentración más alta.



Figura 50. Procedimiento de la contaminación de la muestra sin explotación previa

Primero se realizaron las pruebas de humedad y color, posteriormente las muestras se secaron en la estufa, se pasaron por un tamiz de malla de 2 mm y se colocaron en frascos de vidrio para evitar su contaminación.

En el suelo utilizado como patrón o concentración cero se encontró una estabilidad de agregados es del 212.49%, lo que significa que se trata de un suelo de agregados muy estables con una textura arcillosa, consistente con los resultados encontrados en las pruebas de campo (Tabla 5) y con el contenido de humedad (Tabla 12). Cuando un agregado seco al aire es sumergido en el agua, el aire que está atrapado en los poros es rápidamente desplazado por el agua, aumentándose en este caso la presión interna causando, en consecuencia, el rompimiento de los mismos (Gale et al., 2000).

Los resultados del contenido de humedad (Tabla 13) permitieron ver que se trataba de un suelo absorbente, al aumentar la concentración de detergente hay un aumento en el porcentaje de humedad, también se observa como a medida que aumenta la concentración el pH tiende a ser más básico.

Tabla 13. Resultados de la determinación de humedad, pH y CE

Muestra	%Humedad	pH	CE (mV)
0	16.855	6.41	5.5
1	55.599	7.6	23
2	32.670	8	5.5
3	33.652	8.425	23.5
4	30.624	9.06	42.5
5	33.986	9.415	28.5

Las sales solubles que se encuentran en los suelos en cantidades superiores al 0.1 % están formadas principalmente por los cationes Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} asociados con los aniones Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- y HCO_3^- (Universidad de Chile, 2016), sin embargo es difícil decir si la mezcla con el detergente provoca esa variación en los valores de CE o si se debe a un problema del equipo de medición.

La importancia del contenido de agua que presenta un suelo representa junto con la cantidad de aire, una de las características más importantes para explicar el comportamiento de este (especialmente en aquellos de textura más fina), como por ejemplo cambios de volumen, cohesión, estabilidad mecánica (Universidad Católica de Valparaíso, 2005).

Estos cambios/efectos también se pueden observar en las determinaciones de la densidad y porosidad (Tabla 13); pues una densidad aparente alta indica un suelo compacto o tenor elevado de partículas granulares como la arena. Una densidad aparente baja no indica necesariamente un ambiente favorecido para el crecimiento de las plantas.

Los resultados obtenidos de la densidad de las muestras (Tabla 14) se entienden como de un suelo mineral; las muestras 0,2,4 y 5 corresponden a las de un suelo arcilloso, mientras que 1 y 3 coinciden con un suelo francoso.

Tabla 14. Resultados de la densidad aparente, real y porosidad.

Muestra	Densidad (gr/cm ³)		Porosidad
	Aparente	Real	
0	1.072	1.050	0.128
1	1.225	1.207	2.073
2	1.107	1.087	1.447
3	1.202	1.178	1.772
4	1.046	1.021	2.039
5	1.177	1.177	2.414

Al realizar la determinación de color con las tablas Munsell en la muestra seca se encontró que se trataba de un suelo gris, y en la muestra húmeda de un suelo gris muy oscuro (Tabla 15). El color del suelo refleja la composición así como las condiciones pasadas y presentes de óxido-reducción del suelo (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2009). En este caso, está determinado igualmente por el revestimiento de partículas muy finas de materia orgánica humificada (oscuro).

Tabla 15. Valores en la determinación de color con las tablas de Munsell

Característica	Suelo seco	Suelo húmedo
Matiz (Hue)	7.5 YR	2.5Y
Brillo (Value)/ Intensidad (Chroma)	5/1	3/1
Color	Gris	Gris muy oscuro

En la determinación de textura por el método de Bouyoucos se hicieron los cálculos pertinentes, triángulos estructurales, y se obtuvo que se trata de un suelo Franco arcillo arenoso (Figura 51).

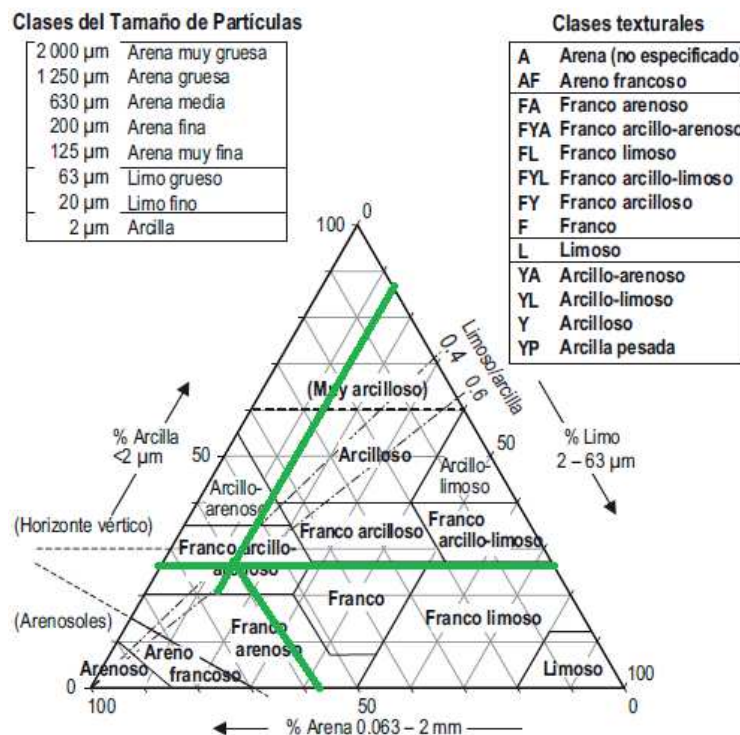


Figura 51. Triángulo de las texturas con los resultados obtenidos

En la Tabla 16 se observa que el contenido de materia orgánica y de nitrógeno total es alto y muy alto, lo que concuerda con los resultados anteriores y con su clasificación como Molisol; la materia orgánica y el nitrógeno total son indicadores del potencial de productividad y de las reservas orgánicas respectivamente.

Tabla 16. Contenido de materia orgánica y nitrógeno total

Muestra	%C _{org}	%Materia orgánica	Clase	%Nitrógeno total	Clase
0	7.893	13.608	Muy alto	0.157	Alto
1	2.468	4.255	Alto	0.166	Alto
2	4.482	7.727	Muy alto	0.273	Muy alto
3	5.572	9.606	Muy alto	0.175	Alto
4	4.821	8.313	Muy alto	0.5	Muy alto
5	5.745	9.906	Muy alto	0.56	Muy alto

4.4 Aplicación de las enterobacterias degradadoras en el suelo

Los microorganismos son el factor más importante de la parte viva del suelo ya que llevan a cabo las funciones de transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos y favorecen el crecimiento de las plantas (Organic Nature, 2017).

4.4.1 Análisis de biotratabilidad

En este análisis se evaluó la degradación de las cinco concentraciones de detergente, expresadas en partes por millón (ppm), en tubos de ensaye con una relación 1:3 de la solución de detergente. Se realizó la inoculación de una colonia en cada tubo, utilizando las cepas de *Serratia marcescens* (“A” y “B”) y de *Pseudomona aeruginosa*.

La densitometría determina la relación entre la masa de células (colonias) y el volumen de solución en la que se encuentran suspendidas mediante el densitómetro; designa las lecturas de las suspensiones de colonias en la escala de unidades McFarland (UMcF) (Lage, Panizo, Ferrara, & Reviakina, 2013).

Las lecturas a las cero horas son del inóculo inicial (fase de latencia); cuando utiliza como fuente de carbono las soluciones de detergente hay un aumento en las lecturas (fase exponencial) si la degradación es muy rápida o se mantienen constantes (fase estacionaria) si la degradación es gradual; los valores de las lecturas disminuyen cuando el detergente se termina (muerte).

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los monitoreos para evaluar su comportamiento con las gráficas correspondientes (Figuras 52 a 60); primero se presentan por cepa bacteriana (Tablas 17 a 19) y posteriormente con respecto a la concentración (Tablas 20 a 25).

Resultados del análisis de biotratabilidad por cepa bacteriana

- *Serratia marcescens* "A"

Con las lecturas obtenidas (Tabla 17) se observó que en la concentración de 16.00 ppm a las 24 horas se alcanzó la fase exponencial; para 32.03 ppm las lecturas permanecieron constantes, en el caso de 48.04 ppm y 64.01 ppm la muerte de la cepa ocurrió dentro de las 48 horas y para 80.14 ppm la degradación fue gradual (Figura 52).

Tabla 17. Resultados en UMcf de *Serratia marcescens* "A"

Tiempo (horas) Concentración (ppm)	0	24	48	72
16.00	0.1	0.4	0.1	0.1
32.03	0.1	0.1	0.1	0.1
48.04	0.1	0.1	0	0
64.01	0.1	0.1	0	0
80.14	0.6	0.3	0.2	0.1

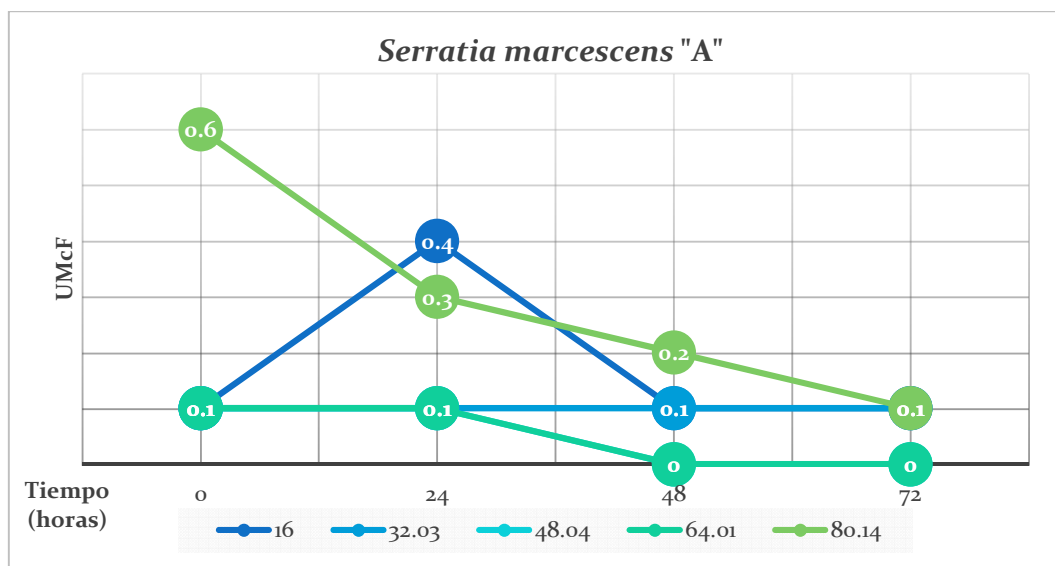


Figura 52. Análisis de biotratabilidad de *Serratia marcescens* "A"

- *Serratia marcescens* "B"

Las lecturas de la Tabla 18 muestran que en la concentración de 16.00 ppm se mantiene en fase estacionaria; con 32.03 ppm se mantiene en fase estacionaria hasta la muerte de la cepa a las 72 horas, mientras que para 48.04 ppm y 64.01 ppm la muerte se da en un rango de 24 horas por lo que la degradación es casi nula; con 80.14 ppm la degradación es gradual de las 24 a las 48 horas (Figura 53).

Tabla 18. Resultados en UMcf de *Serratia marcescens* "B"

Tiempo (horas)	0	24	48	72
16.00	0.1	0.1	0.1	0.1
32.03	0.1	0.1	0.1	0
48.04	0.1	0	0	0
64.01	0.1	0	0	0
80.14	0.3	0.3	0.1	0.1

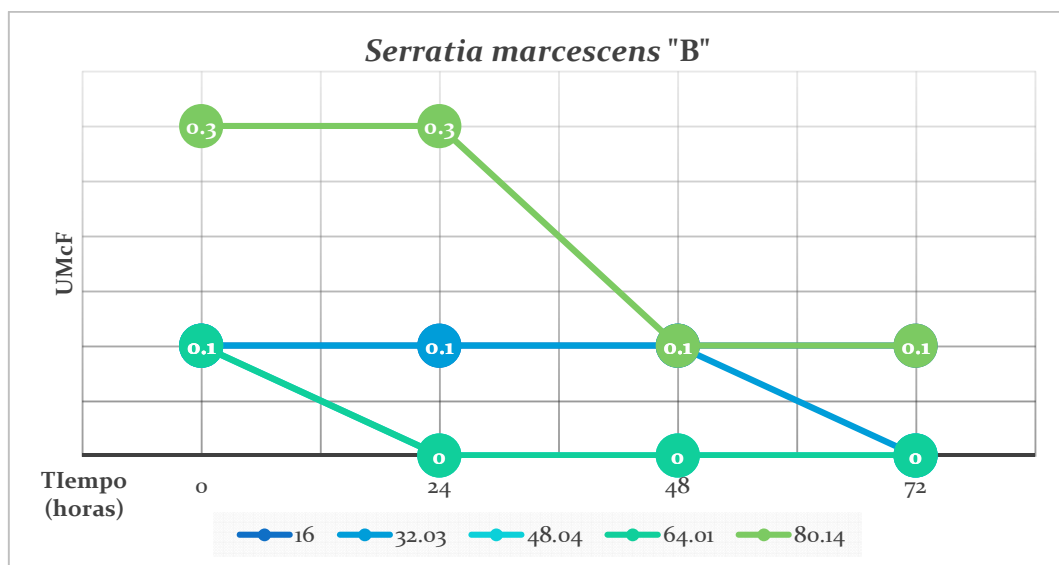


Figura 53. Análisis de biotratabilidad de *Serratia marcescens* "B"

- *Pseudomona aeruginosa*

Al iniciar las lecturas en cero puede inferirse que no hay crecimiento del inóculo en la solución, para la concentración de 16.00 ppm el crecimiento se registró a las 72 horas mientras que para 32.03 ppm se dio a las 24 horas y permaneció en fase estacionaria; en 48.04 ppm se observa una disminución en el número de colonias a las 24 horas, permanece en fase estacionaria por 24 horas y vuelve a aumentar el número de colonias; para las concentraciones de 64.01 ppm y 80.14 ppm la degradación fue gradual (Tabla 19) (Figura 54).

Tabla 19. Resultados en UMcf de *Pseudomona aeruginosa*

Tiempo (días) Concentración (ppm)	0	24	48	72
16.00	0	0	0	0.3
32.03	0	0.1	0.1	0.8
48.04	0.2	0.1	0.1	0.2
64.01	0.5	0.3	0.2	0.1
80.14	0.6	0.4	0.3	0.3

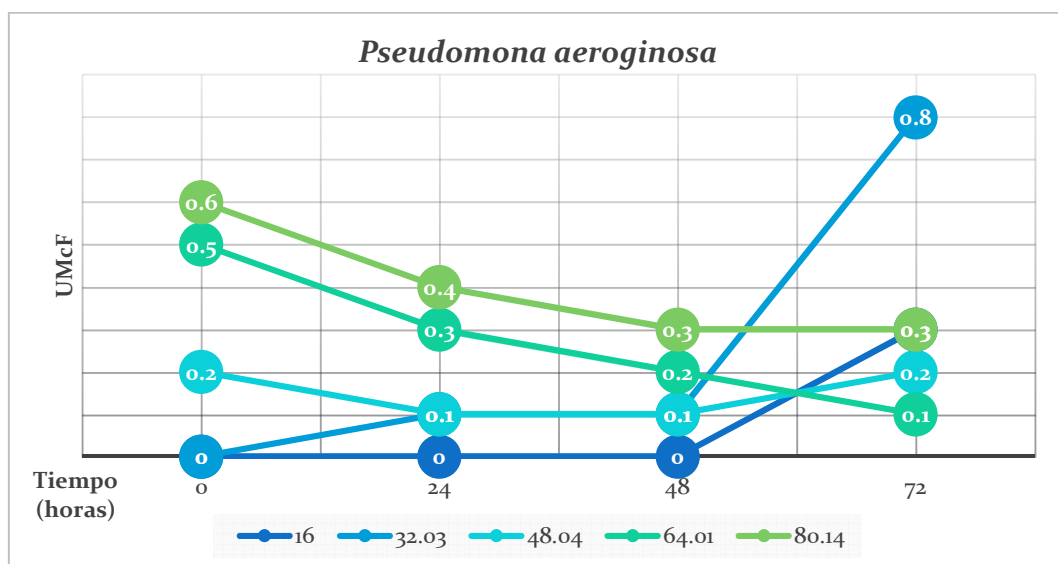


Figura 54. Análisis de biotratabilidad de *Pseudomona aeruginosa*

Resultados por concentración

- *Concentración 1: 16.00 ppm*

Con los resultados de la Tabla 20 se puede observar que *Serratia marcescens* "A" degrada mejor la solución ya que fue la única de la que se registró la fase exponencial, *Serratia marcescens* "B" degradó la solución manteniéndose en fase estacionaria mientras que *Pseudomona aeruginosa* no mostró crecimiento hasta las 72 horas (Figura 55).

Tabla 20. Análisis de biotratabilidad de 16.00 ppm

Cepa	Tiempo (horas)	0	24	48	72
<i>Serratia marcescens</i> "A"		0.1	0.4	0.1	0.1
<i>Serratia marcescens</i> "B"		0.1	0.1	0.1	0.1
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		0	0	0	0.3

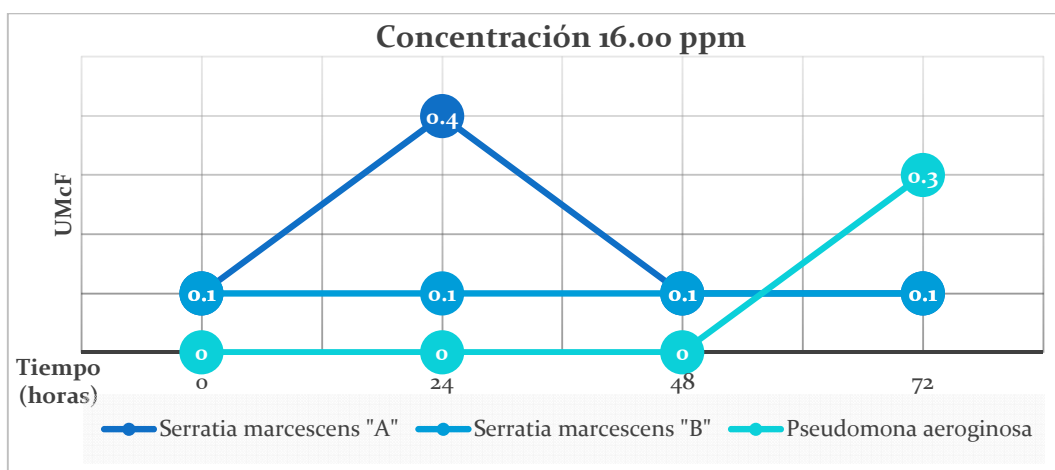


Figura 55. Análisis de biotratabilidad de 16.00 ppm

- *Concentración 2: 32.03 ppm*

Al comparar los resultados de la Tabla 21 *Serratia marcescens* "A" y *Serratia marcescens* "B" degradaron la solución manteniéndose en fase estacionaria, durante 72hr y 48 hr respectivamente, mientras que, *Pseudomona aeruginosa* comenzó su crecimiento dentro de las primeras 24 hr, comenzó a degradar la solución y alcanzó la fase exponencial a las siguientes 48 hr (Figura 56).

Tabla 21. Análisis de biotratibilidad de 32.03 ppm

Cepa	Tiempo (horas)	0	24	48	72
<i>Serratia marcescens</i> "A"		0.1	0.1	0.1	0.1
<i>Serratia marcescens</i> "B"		0.1	0.1	0.1	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		0	0.1	0.1	0.8

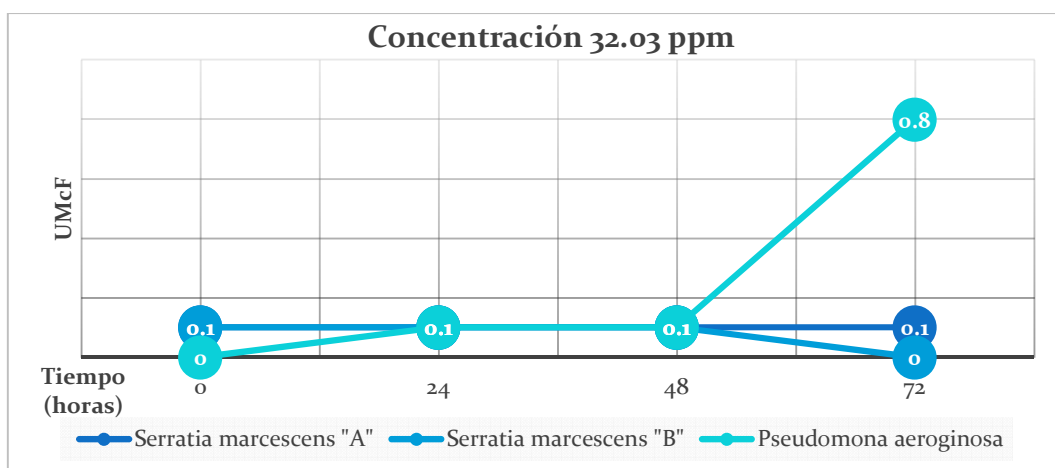


Figura 56. Análisis de biotratibilidad de 32.03 ppm

- **Concentración 3: 48.04 ppm**

En la Tabla 22 se observa que *Serratia marcescens* "B" no degradó la solución y *Serratia marcescens* "A" degrada la solución mientras se mantiene en fase estacionaria las primeras 24 horas, mientras que para *Pseudomona aeruginosa* tuvo una disminución en el número de colonias en las primeras 24 horas, se mantuvo en fase estacionaria las siguientes 48 horas, y después alcanzó su fase exponencial (Figura 57).

Tabla 22. Análisis de biotratibilidad de 48.04 ppm

Cepa	Tiempo (horas)	0	24	48	72
<i>Serratia marcescens</i> "A"		0.1	0.1	0	0
<i>Serratia marcescens</i> "B"		0.1	0	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		0.2	0.1	0.1	0.2

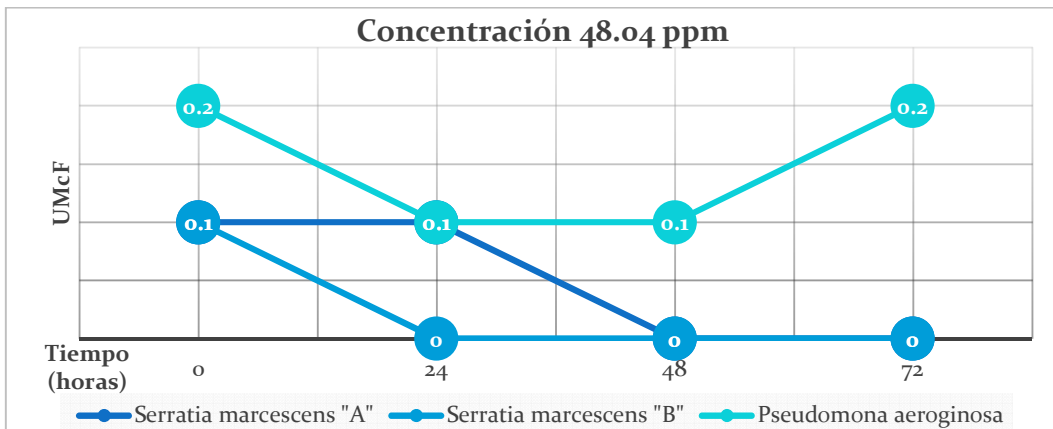


Figura 57. Análisis de biotratabilidad de 48.04 ppm

- **Concentración 4: 64.01 ppm**

En los resultados obtenidos (Tabla 23) se puede observar que *Serratia marcescens* "B" no degrada la solución, *Serratia marcescens* "A" la degrada mientras se mantiene en fase estacionaria durante las primeras 24 horas y *Pseudomona aeruginosa* degrada la solución gradualmente durante las 72 horas de estudio (Figura 58).

Tabla 23. Análisis de biotratabilidad de 64.01 ppm

Cepa	Tiempo (horas)	0	24	48	72
<i>Serratia marcescens</i> "A"		0.1	0.1	0	0
<i>Serratia marcescens</i> "B"		0.1	0	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		0.5	0.3	0.2	0.1

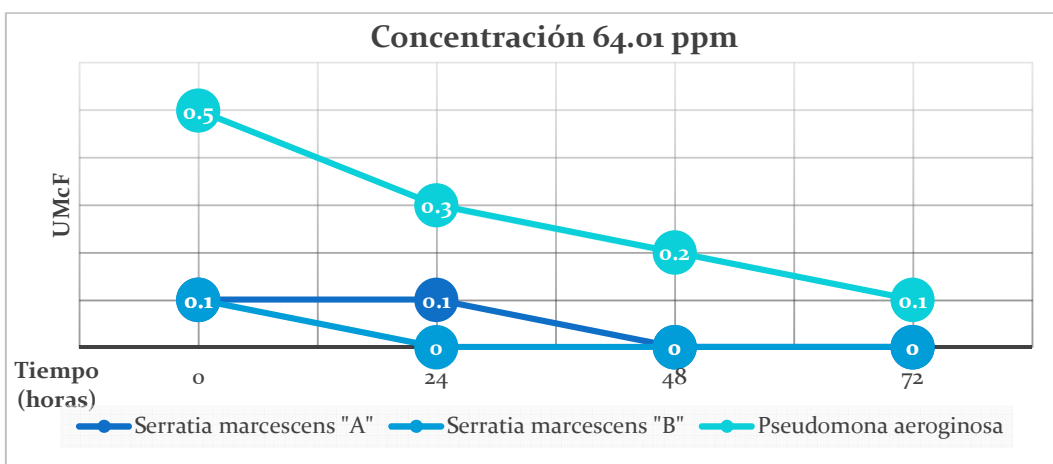


Figura 58. Análisis de biotratabilidad de 64.01 ppm

- **Concentración 5: 80.14 ppm**

En las lecturas registradas en la Tabla 24 se observa que la degradación de las tres cepas es gradual, para *Serratia marcescens* "A" el número de colonias disminuyó gradualmente en los monitoreos mientras que *Serratia marcescens* "B" y *Pseudomona aeruginosa* alcanzaron la fase estacionaria a las 48 horas (Figura 59).

Tabla 24. Análisis de biotratibilidad de 80.14 ppm

Cepa	Tiempo (horas)	0	24	48	72
<i>Serratia marcescens</i> "A"		0.6	0.3	0.2	0.1
<i>Serratia marcescens</i> "B"		0.3	0.3	0.1	0.1
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		0.6	0.4	0.3	0.3

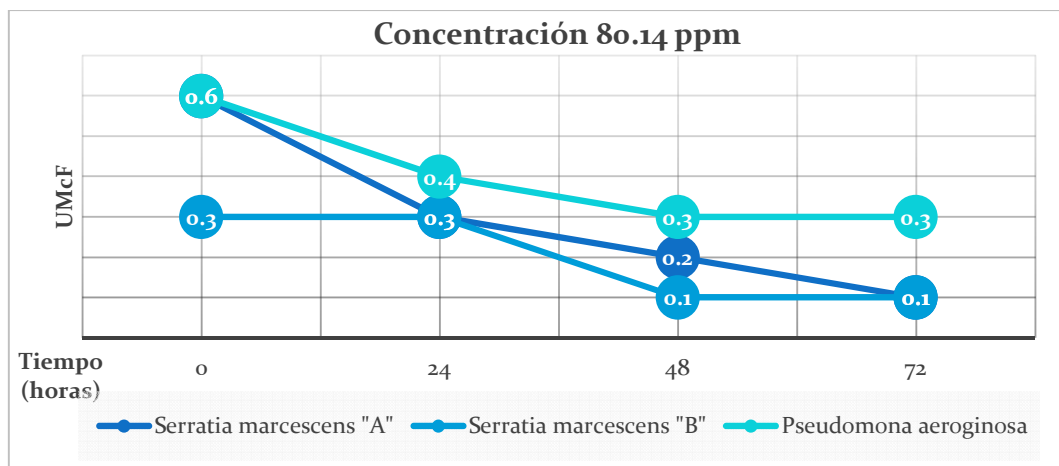


Figura 59. Análisis de biotratibilidad de 80.14 ppm

4.4.2 Inoculación y monitoreo por espectrofotometría UV-Vis

Primero se realizó la contaminación de 1.5 Kg de suelo distribuido en 15 bolsas de 100g, utilizando el volumen de saturación del suelo previamente determinado como medida para las soluciones de detergente, se contaminaron 3 bolsas por solución de detergente para realizar la evaluación de las cepas utilizadas en el análisis de biotratibilidad.

La inoculación del suelo se realizó con la adición de 3 ml de inóculo líquido en cada una de las bolsas (Figura 60), y se realizó el cálculo de la concentración de detergente por kilogramo de suelo (Tabla 25).

Tabla 25. Concentración evaluada en el análisis

Concentración (ppm)	ppm por Kg de suelo
16.00	97.230
32.03	194.63
48.04	291.890
64.01	388.889
80.14	486.859

*ppm es equivalente a g/l

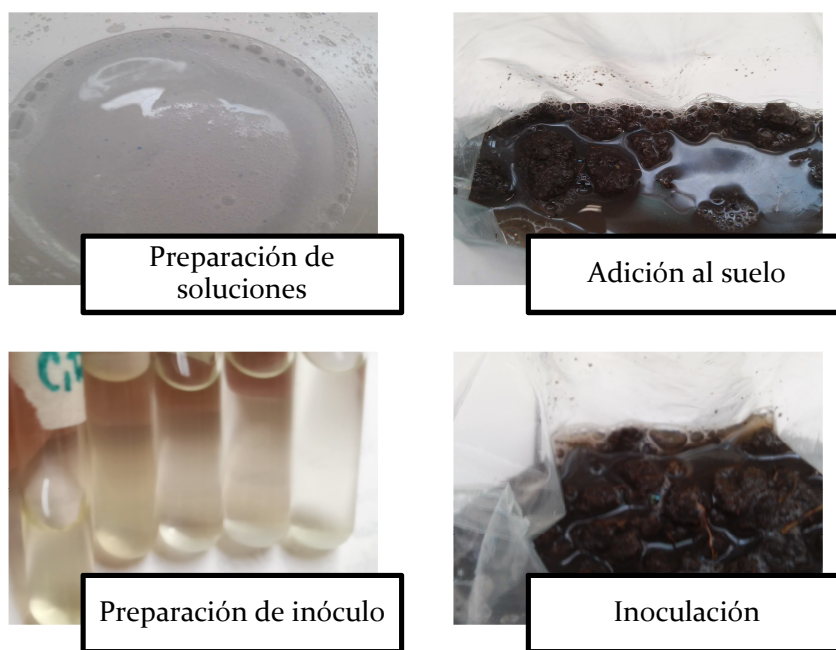


Figura 60. Proceso de inoculación en suelo

En todos los resultados obtenidos del monitoreo en la región Ultravioleta-Visible (UV-Vis), con la misma concentración de suelo por lo que se considera como una constante, se pudieron observar las fases de crecimiento bacteriano. El valor de la absorbancia registrado a los 18 días, al ser mayor que en el primer monitoreo, indica que las cepas aún mantienen un potencial de degradación.

Los resultados se presentan por cepa (Tablas 26 a 28) y con respecto a su concentración (Tablas 29 a 33), con las gráficas correspondientes (Figuras 61 a 68).

Resultados del monitoreo UV-Vis por cepa bacteriana

- *Serratia marcescens* “A”

El mejor desempeño de la cepa se da en la concentración de 48.04 ppm (Tabla 26) ya que tiene la lectura más alta después de 18 días (Figura 61).

Tabla 26. Resultados en absorbancia de *Serratia marcescens* “A”

Tiempo (días) Concentración (ppm)	2	4	7	18
16.00	46.666	716.666	2766.667	265
32.03	56.666	783.333	2300	188.333
48.04	33.333	383.333	2433.333	311.666
64.01	23.333	366.666	1166.667	156.666
80.14	56.666	450	1633.333	95

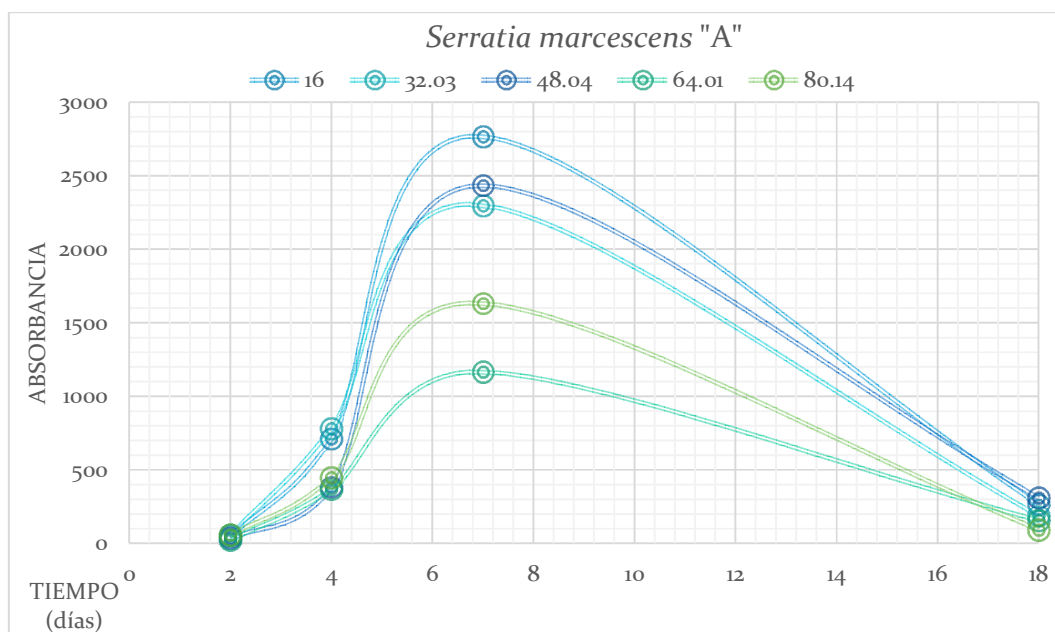


Figura 61. Resultados del monitoreo UV-Vis de *Serratia marcescens* “A”

- *Serratia marcescens* “B”

En la Tabla 27 se observa que a los 7 días la cepa registra valores más altos con las concentraciones de 16.00 ppm y 32.03 ppm, sin embargo a los 18 días es en 80.14ppm donde se registra el valor más alto (Figura 62).

Tabla 27. Resultados en absorbancia de *Serratia marcescens* “B”

Tiempo (días) Concentración (ppm)	2	4	7	18
16.00	176.666	1216.667	3733.333	215
32.03	116.666	1033.333	3033.333	220
48.04	53.333	2566.667	2466.667	265
64.01	196.666	1416.667	2200	345
80.14	110	583.333	2066.667	1036.667

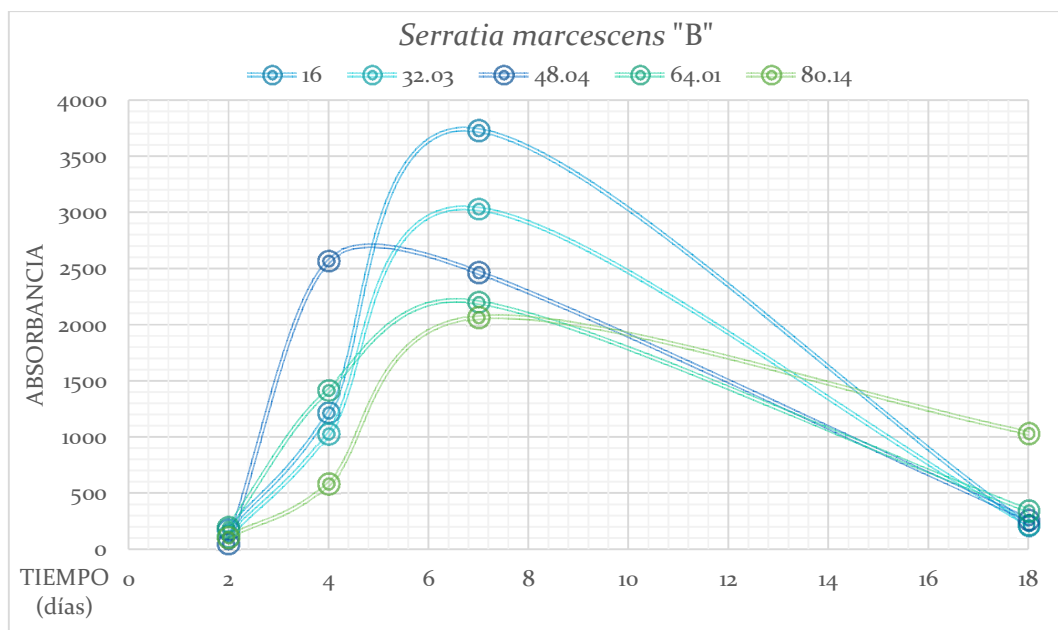


Figura 62. Resultados del monitoreo UV-Vis de *Serratia marcescens* “B”

- *Pseudomona aeruginosa*

En la Tabla 28 se puede observar que a después de 4 días las lecturas más altas se dieron con 48.04 ppm, y, en el séptimo día de monitoreo las lecturas más altas se dieron para 16.00 ppm, sin embargo, para esas concentraciones en el

monitoreo de los 18 días se puede observar la igualación de sus valores de absorbancia (Figura 63).

Tabla 28. Resultados en absorbancia de *Pseudomona aeruginosa*

Tiempo (días) Concentración (ppm)	2	4	7	18
16.00	70	983.333	2766.667	196.666
32.03	146.666	866.666	2233.333	195
48.04	86.666	1333.333	2466.667	196.666
64.01	50	283.333	2366.667	143.333
80.14	86.666	583.333	1800	128.333

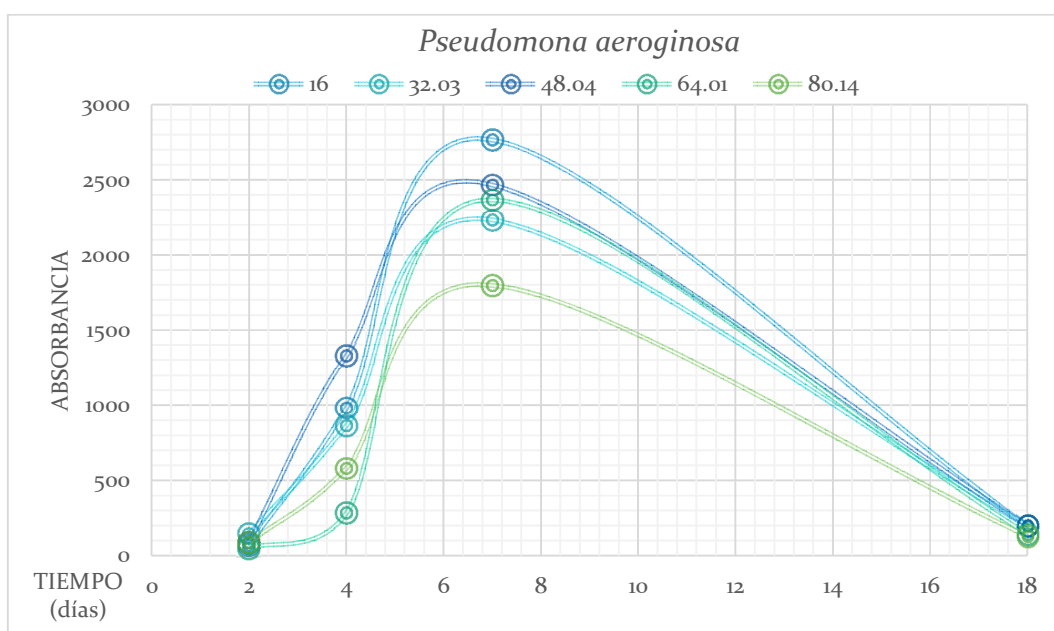


Figura 63. Resultados del monitoreo UV-Vis de *Pseudomona aeruginosa*

Resultados del monitoreo UV-Vis por concentración

- **Concentración 1: 16.00 ppm**

Serratia marcescens “B” degrada más rápido el detergente ya que registró las lecturas más altas en los monitoreos; *Serratia marcescens* “A”, al igual que *Pseudomona aeruginosa* mantuvo una degradación gradual (Tabla 29), en el decimoctavo día de estudio se mantuvo un poco más estable que *Serratia marcescens* “B” (Figura 64).

Tabla 29. Resultados del monitoreo UV-Vis de 16.00 ppm

Tiempo (días) Concentración (ppm)	2	4	7	18
<i>Serratia marcescens</i> "A"	46.666	716.666	2766.667	265
<i>Serratia marcescens</i> "B"	176.666	1216.667	3733.333	215
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	70	983.333	2766.667	196.666

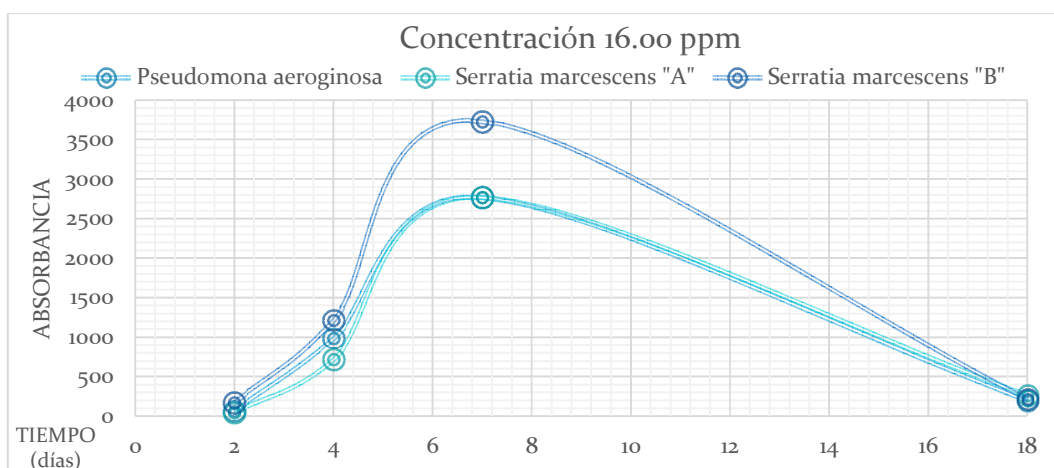


Figura 64. Resultados del monitoreo UV-Vis para 16.00 ppm

- **Concentración 2: 32.03 ppm**

En el primer monitoreo *Pseudomona aeruginosa* registró la lectura más alta, en los siguientes *Serratia marcescens* "B" degrada más rápido el detergente manteniendo las lecturas más altas (Tabla 30); *Serratia marcescens* "A" realiza una degradación lenta en comparación a *Pseudomona aeruginosa* hasta el séptimo día de estudio (Figura 65).

Tabla 30. Resultados del monitoreo UV-Vis de 32.03 ppm

Tiempo (días) Concentración (ppm)	2	4	7	18
<i>Serratia marcescens</i> "A"	56.666	783.333	2300	188.333
<i>Serratia marcescens</i> "B"	116.666	1033.333	3033.333	220
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	146.666	866.666	2233.333	195

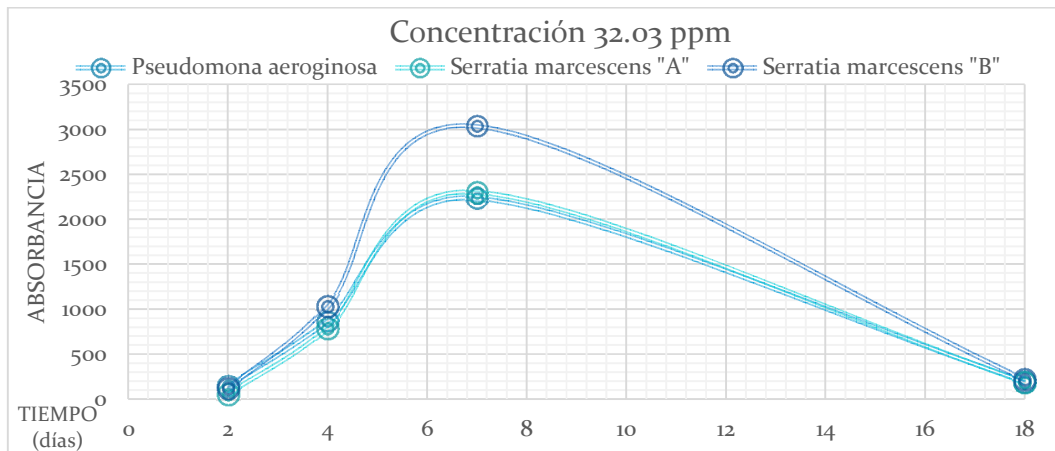


Figura 65. Resultados del monitoreo UV-Vis para 32.03

- **Concentración 3: 48.04 ppm**

Pseudomona aeruginosa mostró mayor crecimiento en el primer monitoreo, en el segundo *Serratia marcescens* “B” registró las lecturas más altas en el segundo monitoreo, sin embargo en el tercero ambas igualan sus valores de absorbancia (Tabla 31); *Serratia marcescens* “A” realizó una degradación gradual y después de 18 días mostró mayor estabilidad que las otras cepas. (Figura 66).

Tabla 31. Resultados del monitoreo UV-Vis de 48.04 ppm

Tiempo (días)	2	4	7	18
Concentración (ppm)				
<i>Serratia marcescens</i> "A"	33.333	383.333	2433.333	311.666
<i>Serratia marcescens</i> "B"	53.333	2566.667	2466.667	265
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	86.666	1333.333	2466.667	196.666

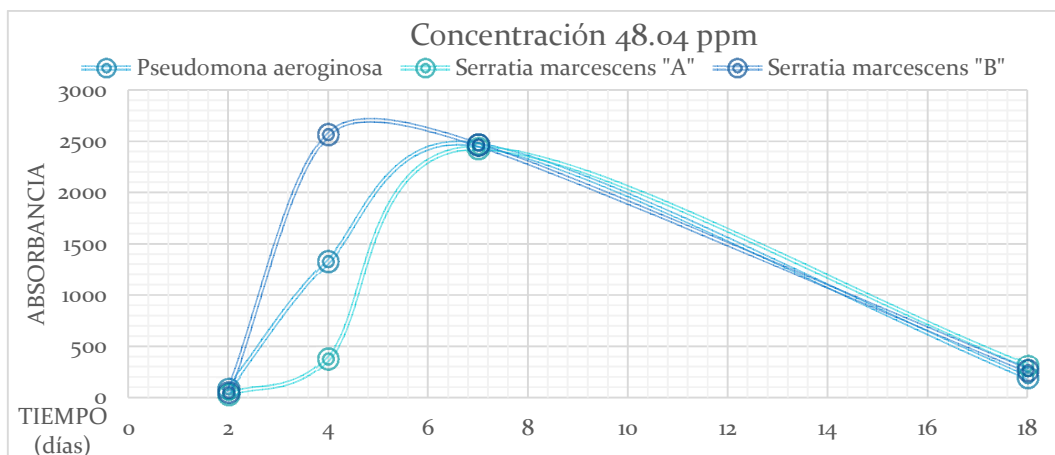


Figura 66. Resultados del monitoreo UV-Vis para 48.04 ppm

- **Concentración 4: 64.01 ppm**

Con esta concentración *Serratia marcescens* “B” mostró una rápida degradación y estabilidad al registrar altos valores de absorbancia durante todo el estudio (Figura 67); *Pseudomona aeroginosa* mostró un valor mayor a *Serratia marcescens* “A” hasta el decimoctavo día, ambas mostraron valores estables durante los monitoreos (Tabla 32).

Tabla 32. Resultados del monitoreo UV-Vis de 64.01 ppm

Tiempo (días)	2	4	7	18
Concentración (ppm)				
<i>Serratia marcescens</i> "A"	23.333	366.666	1166.667	156.666
<i>Serratia marcescens</i> "B"	196.666	1416.667	2200	345
<i>Pseudomona aeroginosa</i>	50	283.333	2366.667	143.333

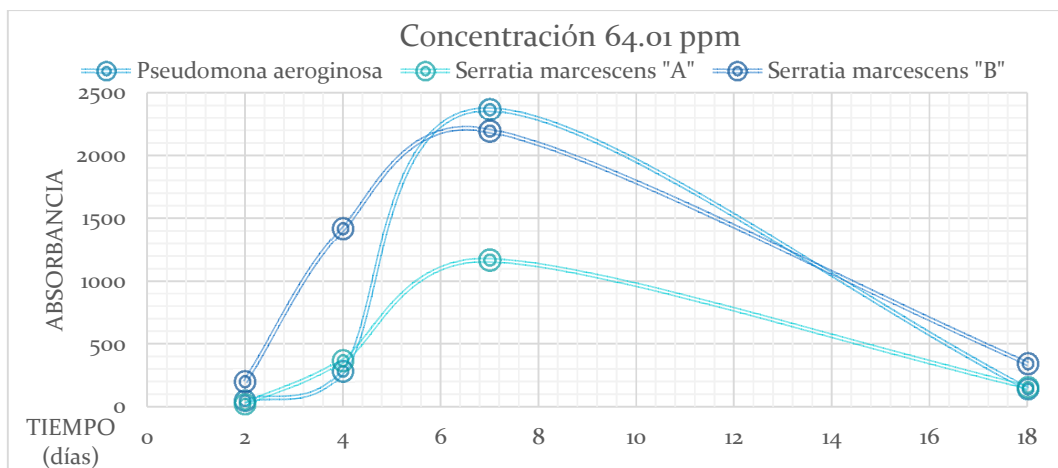


Figura 67. Resultados del monitoreo UV-Vis para 64.01 ppm

- **Concentración 5: 80.14 ppm**

Al comparar los resultados de la Tabla 33 podemos observar que las cepas se encuentran en fase exponencial hasta el séptimo día, *Serratia marcescens* “A” registró los valores más bajos, *Pseudomona aeroginosa* se mantuvo estable, mientras que *Serratia marcescens* “B” mostró los valores de absorbancia más altos y estables ya que a los 18 días la disminución en las lecturas indicaron que apenas había iniciado su fase de muerte (Figura 68).

Tabla 33. Resultados del monitoreo UV-Vis de 80.14 ppm

Tiempo (días)	2	4	7	18
Concentración (ppm)				
<i>Serratia marcescens</i> "A"	56.666	450	1633.333	95
<i>Serratia marcescens</i> "B"	110	583.333	2066.667	1036.667
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	86.666	583.333	1800	128.333

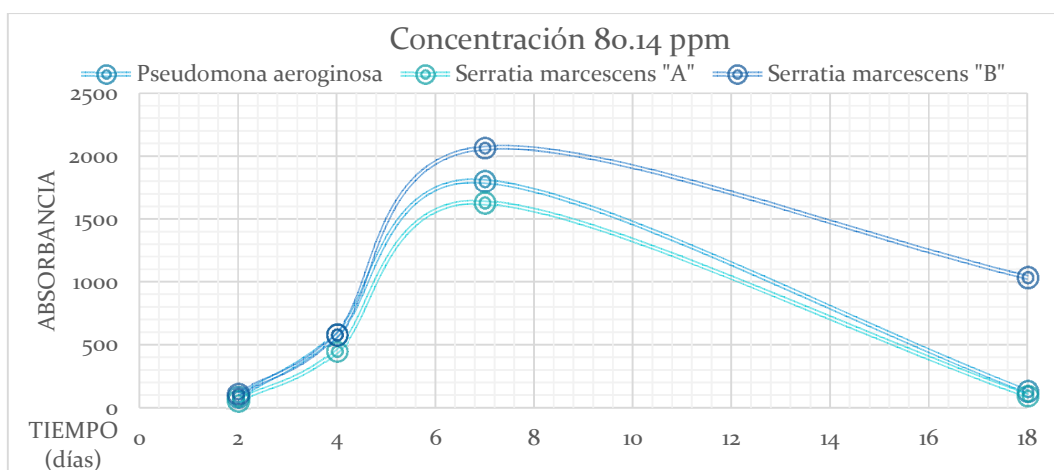


Figura 68. Resultados del monitoreo UV-Vis para 80.14 ppm

4.5 Conservación de cepas

La conservación de las cepas se realizó por medio de la congelación de inóculos líquidos de las cepas (Figura 69).



Figura 69. Inóculos en tubos eppendorf

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Este proyecto evaluó la degradación de un detergente aniónico comercial de lavandería por enterobacterias aisladas de un suelo contaminado por limpiadores líquidos multiusos. Para la identificación de su género y especie se utilizaron medios selectivos, pruebas bioquímicas, de catalasa, oxidasa y tinción de Gram.

Se observó su comportamiento al cambiar las condiciones de crecimiento, como la temperatura y las fuentes de carbono, con el fin de probar su adaptación en cultivos en placa para su posterior aplicación en ensayos de biotratabilidad en un medio líquido.

Los análisis microbiológicos identificaron a *Serratia marcescens* y *Pseudomona aeruginosa* y en las pruebas de susceptibilidad demostraron un alto potencial de degradación; los resultados de *Pseudomona aeruginosa* se utilizaron como referencia para evaluar a *Serratia marcescens*, porque es un microorganismo sumamente adaptable que puede usar más de 80 compuestos orgánicos para la proliferación (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994).

También se realizaron pruebas fisicoquímicas para identificar como el contaminante afecta las características particulares del suelo con el que interactúa, utilizando cinco muestras de suelo contaminado artificialmente con soluciones saturadas del detergente con concentraciones de 16.00, 32.03, 48.04, 64.01 y 80.14 ppm. Los resultados obtenidos permitieron observar que el porcentaje de humedad, pH, CE, densidad (aparente y real) y porosidad aumentan proporcionalmente con la concentración del detergente, mientras que, el porcentaje de carbono orgánico, materia orgánica y nitrógeno total disminuyen.

Los resultados de la aplicación de *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa* en el suelo permitieron observar que las cepas alcanzan el punto máximo de su fase exponencial a los 7 días de la inoculación, mientras que, en los 18 días de estudio las cepas mostraron lecturas mayores a las iniciales. Esto se puede interpretar como que después de 18 días las cepas mantienen su potencial de degradación.

Pseudomonas aeruginosa mostró mejores resultados en las pruebas de degradación en placa y en las pruebas de biotratibilidad, con excepción del análisis con la concentración de 16 ppm. Sin embargo, *Serratia marcescens* utilizó el suelo como medio de soporte, y por consecuencia sus resultados fueron superiores.

BIBLIOGRAFÍA

- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología y Microbiología ambiental*. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN S. A.
- Atlas, R., Levin, M., Sandler, R., & Rogul, M. (1992). *Microbial ecology: Principles, methods and application*. McGraw Hill.
- Biosan: Medical-Biological Research & Technologies. (2017). *Fotómetros, Densitómetros*. Obtenido de DEN-1, Densitómetro (detector de turbidez por suspensión): <https://biosan.lv/es/productos/grupo-de-productos/densitmetros-fluormetro/den-1-densitometer-suspension-turbidity-detector>
- Brenner, T. E. (1969). Biodegradable detergents and water pollution. *Advances in Environmental Science Technology*, 147-196.
- Britania Lab. (2010). *Productos*. Obtenido de Mac Conkey Agar: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/bo2/maconkeyagar.htm>
- Burt, R. (2014). *Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual*. Lincoln, Nebraska: United States Department of Agriculture.
- Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. (2007). *La biotecnología*. Obtenido de La biorremediación: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=202>
- Coraspe, H., & Tejera, S. (Diciembre de 1996). *Procedimiento para la toma de muestras de suelos*. Obtenido de Pasos a seguir en el muestreo de suelos: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd54/suelos.htm
- Cserhádi, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environmental International*, 337 - 348.
- Department of the Environment. (1995). *Industry Profile: Chemical works*. Obtenido de Soap and detergent manufacturing works.
- Departamento de agronomía de los Estados Unidos. (1995). *Claves para la taxonomía de suelos*. Ciudad de México: Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo.
-

Obtenido de Claves para la taxonomía de suelos:
<https://www.oas.org/dsd/publications/Unit/oea3os/cho26.htm#a.2.5%20suelos%2odel%2oorden%2omolisol>

ERASM. (2009). *Environment & Health Risk Assessment and Management*. Obtenido de Removal of detergent surfactants in waste-water treatment plant:
<http://www.erasm.org/position/Paper5-RemovalStatement.pdf>

Galán, J. I., Moreno, J., & Torra, M. (2009). Metodología para el estudio de suelos contaminados y aplicación de técnicas avanzadas para su investigación. *Infoenviro*, 80 - 82.

García, J., García, E., & Fresnadillo, M. (26 de Junio de 2010). *Universidad de Salamanca*. Obtenido de Pruebas de sensibilidad bacteriana:
http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html

García, M. D., & Uruburu, F. (2016). *La conservación de cepas microbianas*. Valencia: Universidad de Valencia.

Hernández-Acosta, E., Ferrera-Cerrato, R., & Rodríguez, V. R. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *TERRA Latinoamericana*, 81 - 89.

Hidalgo, M., & Ortiz, I. (2016). *Biodegradación de surfactantes aniónicos por bacterias autóctonas del suelo*. Puebla.

Hill, J. W., & Kolb, D. K. (1999). *Química para el nuevo milenio*. Ciudad de México: PEARSON Prentice Hall.

Huerta, A. (2010). *Universidad Politecnica Javeriana*. Obtenido de Determinación de la densidad con el método del picnómetro:
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12655/11.%20Art%C3%ADculo%20docente.%20Determinaci%C3%B3n%20de%20la%20densidad%20de%20un%20ol%C3%ADquido%20con%20el%20m%C3%A9todo%20del%20picn%C3%B3metro.pdf?sequence=1>

Instituto Nacional de Ecología. (2004). Análisis microbiológicos. En I. N. Ecología, *Manual de técnicas de análisis de suelos* (págs. 117 - 159). Ciudad de México: Instituto Nacional de Ecología.

- Instituto Nacional de Ecología. (22 de Agosto de 2007). Análisis físicos y químicos en suelo. En I. N. Ecología, *Manual de técnicas de análisis de suelos* (págs. 19 - 87). Ciudad de México: Instituto Nacional de Ecología. Obtenido de Análisis físicos y químicos en suelo: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/509/analisis.pdf>
- Joklik, W., Willett, H., Amos, B., & Wilfert, C. (1994). *Zinsser Microbiología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Keller, T., & Håkansson, I. (2010). Estimation of reference bulk density from soil particle size distribution and soil organic matter content. *Geoderma*, 398 - 406.
- L., J. (14 de Abril de 2009). *Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias*.
- Lage, L., Panizo, M. M., Ferrara, G., & Reviakina, V. (2013). Validación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 46 - 52.
- Larson, R. J. (1990). Structure-activity relationships for biodegradation of linear alkylbenzenesulfonates. *Environmental Science and Technology*, 1241-1246.
- León, C. (2000). *Propiedades de los suelos*. Cartagena: Corpoica.
- Lobo, D., & Pulido, M. (2013). *Universidad Central de Venezuela*. Obtenido de Instituto de Edafología: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30160/30160_AVA/30160_DocsAVA_U2/Metodos_ev_estruct.pdf
- López Mahía, P., Muniategui, S., & Prada Rodríguez, D. (2005). SURFACTANTS AND DETERGENTS. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, 554-561.
- Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. Ciudad de México: Reverté.
- Metting, F. B. (1993). *Soil Microbial Ecology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Organic Nature. (2017). *Organic Nature México*. Obtenido de Consorcio Microbiano Benéfico: <http://onfertilizantes.com/productos/consorcio-microbiano-benefico/>

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2009). *Guía para la descripción de suelos*. Roma: FAO.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2015). *Conservación de los recursos naturales para una agricultura sostenible*. Obtenido de Materia orgánica y actividad biológica: http://www.fao.org/ag/Ca/Training_Materials/CD27-Spanish/ba/organic_matter.pdf
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (17 de Noviembre de 2006). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Obtenido de Textura del suelo: ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_training/FAO_training/General/x67o6s/x67o6so6.htm#top
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016). *Portal de suelos de la FAO*. Obtenido de Propiedades físicas del suelo: <http://www.fao.org/soils-portal/levantamiento-de-suelos/propiedades-del-suelo/propiedades-fisicas/es/>
- Ortiz, I. S., Dorado, M., & Villar, S. (2006). *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. Madrid: Comunidad de Madrid.
- Picazo, J. (2000). *Microbiología general y bulcal*. Barcelona: Universidad de Salamanca.
- Porta, J., & López-Acevedo Riguerín, M. (2005). *Agenda de campo de suelos. Información de suelos para la agricultura y el medio ambiente*. Madrid: Mundi Prensa.
- Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 3426 - 3431.
- Rao, P., & He, M. (2006). Adsorption of anionic and nonionic surfactant mixtures from synthetic detergents on soils. *Chemosphere*, 1214 - 1221.
- Rittman, B. &. (2001). *Bioteconología del Medio Ambiente: Principios y Aplicaciones*. Madrid.: McGraw-Hill. .
- Rodríguez, E., Gamboa, M. d., Hernández, F., & García, J. (2005). *Bacteriología General. Principios y prácticas de laboratorio*. San José: Universidad de Costa Rica.

- Rubio, A. M. (Julio de 2010). *Universidad de Sevilla*. Obtenido de La densidad aparente en suelos forestales del parque natural los alcornocales: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/57951/1/La%20densidad%20aparente%20oen%20suelos%20forestales%20.pdf>
- Ruda de Schenquer, E., Mongiello, A., & Acosta, A. (2004). *Contaminación y salud del suelo*. Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.
- Ruiz, P. (27 de Septiembre de 2011). *Estudiando microorganismos*. Obtenido de Pruebas bioquímicas primarias: <https://microbitos.wordpress.com/2011/09/27/pruebas-bioquimicas-primarias/>
- Salager, J.-L. (2002). *Surfactantes*. Caracas: Universidad de los Andes. Obtenido de Laboratorio de formulación, interfases, reología y procesos.
- Sancho, P. (2008). *Universidad de Alcalá*. Obtenido de Bioquímica Ambiental: http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/biorremediacion.pdf
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (31 de Diciembre de 2002). *Diario Oficial de la Federación*. Obtenido de Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002
- Seoáñez, M. (1999). *Contaminación del suelo: estudios, tratamiento y gestión*. Ciudad de México: Ediciones Mundi-Prensa.
- Soil Science Society of America. (6 de Noviembre de 2015). *Soil Science Society of America*. Obtenido de Glossary of soil science terms: <https://www.soils.org/publications/soils-glossary/>
- Stermitz, F. R., & Weininger, S. J. (1988). *Química Orgánica*. Barcelona: Reverté S. A.
- Taboada, M. A., & R., A. C. (2008). *Fertilidad física de los suelos*. Buenos Aires: Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.
- Universidad Católica de Valparaíso. (2005). *Grupo de Geotecnia*. Obtenido de Determinación del contenido de humedad: http://icc.ucv.cl/geotecnia/o3_docencia/o2_laboratorio/manual_laboratorio/humedad.pdf

- Universidad de Alcalá. (11 de Marzo de 2014). *Cuaderno de laboratorio*. Obtenido de Diluciones seriadas: <http://www3.uah.es/cuadernolab/p/index.php/diluciones-seriadas/>
- Universidad de Chile. (2016). *Pregrado en Ciencias de la Tierra*. Obtenido de Determinación del pH y conductividad eléctrica del suelo: http://mct.dgf.uchile.cl/AREAS/medio_mod1.1.htm
- Universidad de Granada. (2016). *Prácticas de microbiología*. Obtenido de Catalasa y oxidasa: http://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-catalasa_oxidasa.htm
- Universidad Politécnica de Catalunya BarcelonaTech. (2011). *Ferra Lavandería Industrial*. Obtenido de Historia del jabón y del detergente: <http://www.lavanderiamadrid.com/recomendaciones/88-recomendaciones-para-el-lavado-de-ropa/91-historia-del-detergente.html>