



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS Y HONGOS EN
SUELOS IMPACTADOS CON DESECHOS URBANOS PROVENIENTES
DEL SECTOR "EL EREIGÜE", SAN JOAQUÍN EDO. CARABOBO,
VENEZUELA**

Elaborado por: Luis Montaner

Bárbula, mayo de 2011



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS Y HONGOS EN
SUELOS IMPACTADOS CON DESECHOS URBANOS PROVENIENTES
DEL SECTOR "EL EREIGÜE", SAN JOAQUÍN EDO. CARABOBO,
VENEZUELA**

*Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad de
Carabobo, para optar al Título de Licenciado en Química*

Tutor: Profesor Arnaldo Armado

Elaborado por: Luis Montaner
C.I.: V-17399661

Bárbula, mayo de 2011

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), según oficio N° CDCH-AM-018-11 del 05 de abril de 2011.

Dedicatoria:

A mí.

Agradecimientos

*Este trabajo representa para mí una muy pequeña parte del producto de años de esfuerzo de mis padres, hermanas, familiares y amigos ya que cada una de estas personas han colaborado de alguna u otra forma en mi bienestar y crecimiento personal y profesional, así que con todo el gusto y la sinceridad que me caracteriza, a través de este pequeño apartado les doy las **Gracias** por haber estado conmigo en las buenas y en las “no tan buenas”, por haberme aconsejado de la mejor manera posible, por haberme apoyado en los momentos más difíciles durante esta travesía, por haber soportado mi mal humor en los tiempos difíciles, por disculparme cuando tuve que cambiar su compañía por átomos y tablas periódicas y sobretodo porque se que seguirán haciéndolo con mucho gusto y sin interés alguno...*

*Le agradezco a mi **Dios** por haberme dado el tesoro más valioso del universo: **La Vida**. Y como si fuera poco, otorgarme el don de la inteligencia ¡Gracias Dios, te llevo siempre en mi corazón!*

*A mi **padre** y a mi **madre**, que todos los días buscan y **ENCUENTRAN** la manera de facilitar un poco más mi vida y siempre están dispuestos desinteresadamente a sacrificar cualquier cosa por mi felicidad, los quiero muchísimo.*

*A mi hermana **Gabriela**, por mostrarme el gran valor de los errores, haberme demostrado que los fracasos no existen y hacerme entender que nada es imposible.*

*A mi hermana **Claudia**, por ser ejemplo de esfuerzo y dedicación y por hacerme saber que el tiempo alcanza para todo y para todos.*

*A mi cuñado **Pedro**, quien admiro mucho y me ha dado a entender que por mas alto que se llegue siempre se puede un poco mas.*

*A mi abuela **Ledia**, por recordarme todos los días que después de la tormenta siempre viene la calma*

*A mi abuelo **Manuel**, por mostrarme que hasta en el último segundo hay que tener fe y con ella se puede vencer al enemigo más fuerte.*

*Muy especialmente a mi sobrino **Juan Pablo**, por hacerme ver la belleza de la inocencia y quien ya a su corta edad (1 añito) ha empezado a demostrarme su gran afecto aprendiéndose mi nombre.*

*A Carlos Borges (**Carlitos**), por ofrecerme su ayuda incondicional y desinteresada, por acompañarme en el momento más importante de mi vida hasta ahora y por preocuparte tanto como yo por mis problemas e intereses.*

A Ramón Piñero a Luis Galíndez y a José Gregorio Limonta por ofrecerme su valiosa amistad, por estar pendiente siempre de los acontecimientos que suceden en mi vida, por ofrecerme ayuda en cualquier momento, por recordarse de mí todos los días, por demostrarme a cada instante que cuento con ustedes para todo, y por hacerme saber que en ustedes tengo a tres grandes amigos ¡los quiero mucho!

A Jean Carlos Pérez Zambrano, por hacerme reír en los momentos duros, por hacerme saber que puedo contar contigo para LO QUE SEA y por tener la virtud de hacerle mejorar el ánimo a cualquier persona con mucha facilidad; te quiero mucho amigo.

A Adrián Bueno, por estar muy pendiente de mi bienestar y ofrecerme su compañía en los momentos más importantes de mi vida.

A Arnaldo Armado ¡Gracias profe! Por no haber sido un docente más del montón, por transmitirme sus valiosos conocimientos desinteresadamente y con entusiasmo, por cumplir a cabalidad sus labores como profesor y amigo hacia mí persona, por haberme enseñado la belleza de la bioquímica, por haber dedicado tiempo no remunerado enfocado a mi enseñanza y a mi crecimiento profesional y sobretodo por tener la vocación necesaria para hacer Ciencia en la Universidad de Carabobo. Si todos los docentes educaran como usted, el mundo sería un lugar mejor.

A Ruth Álvarez, por haberme enseñado con precisión y exactitud las técnicas de laboratorio, por ser integral y tener vocación, por ser para mí una fuente de inspiración y por haberme ofrecido su mano amiga cuando de problemas personales se trataba. Profe, usted es mi ejemplo cuando digo que si existen profesores que se preocupan e invierten tiempo desinteresado por el bienestar de sus alumnos, ¡Gracias!

A Jhonnán, por ofrecerme su valiosa ayuda personal e intelectual, por ayudarme a llevar a cabo tareas difíciles y a cumplir una meta en la realización de este trabajo, ¡Gracias amigo!

A Derlys, Gracias por saber corresponder a la amistad que te ofrezco y por estar ahí cuando he dicho “necesito un amigo”.

A Desiree (Desi), por ponerle alegría a los días mas complicados en el laboratorio, por ser como eres, tan bella como tu inocencia. ¡Te quiero mucho Desi!

A Soyibel (Soyi), uuuuuuunnnnaaaawaaraaaaaa Soyi!!! Gracias por estar pendiente de todo, por ser solidaria y ponerle buen humor a todas las cosas. ¡Te quiero mucho!

A Sikleb, por ayudarme en las labores del laboratorio y por transmitirme tus conocimientos muy amablemente.

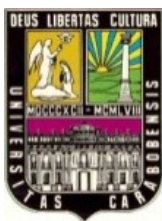
*A Gabriel (**Gabo**), por estar dispuesto a ayudarme en cualquier cosa, confiar en mí y considerarme tu amigo ¡Te aprecio mucho amigo!*

*A **Rodolfo** ¡Gracias amigo! Por alegrarte cada vez que te enteras de las cosas buenas que me suceden y muchas gracias por incluirme en tus oraciones.*

*A Anyohindra (**Año**), por estar siempre de buen humor y no decir que no cuando de diversión se trata.*

Todos ustedes ocupan un lugar muy especial en mi mente y en mi corazón, y cada vez que ejecute mis labores como químico los recordaré por haberme ayudado de alguna u otra manera a realizar este sueño.

*También agradezco al señor **José Santoy** (encargado y custodio del antiguo vertedero en estudio) al profesor **Doménico Pavone**, al licenciado **Héctor Pérez** y a la licenciada **Carolina Gaester** por su colaboración en la tesis, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (**CDCH**) por su colaboración para la realización de este proyecto, a la **Universidad de Carabobo** por brindarme la oportunidad de graduarme y a la **Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología**, por permitirme utilizar sus instalaciones para desarrollarme como químico.*



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS Y HONGOS EN SUELOS IMPACTADOS CON DESECHOS URBANOS PROVENIENTES DEL SECTOR “EL EREIGÜE”, SAN JOAQUÍN EDO. CARABOBO, VENEZUELA

Br. Luis Montaner

RESUMEN

Las actividades cotidianas del ser humano que involucran a los desechos sólidos urbanos pueden ser determinantes en la vida microbiológica de los ambientes donde se desarrollen. El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad de microorganismos existentes en suelos con presencia y ausencia de desechos sólidos urbanos como contaminantes, provenientes del sector “El Ereigüe”, San Joaquín, Estado Carabobo, Venezuela. Se tomaron 18 muestras de suelo donde se observó la presencia de desechos sólidos urbanos y a una distancia aproximada de dos kilómetros se tomaron muestras control. El conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc) se realizó en placas de petri utilizando agar LB como medio de crecimiento, complementado con Ciprofloxacina® para el crecimiento de hongos y con Fluconazol® para el crecimiento de bacterias. Para los microorganismos fijadores de nitrógeno se utilizó medio Burk's con agar-agar como gelificante, para los microorganismos productores de amilasas se utilizó agar LB suplementado con almidón, para productores de celulasas se empleó medio mínimo con agar-agar como gelificante suplementado con celulosa microcristalina y para los productores de proteasas, medio mínimo con agar-agar como gelificante suplementado con caseína. Se encontró que los desechos sólidos urbanos afectaron de manera diversa a las comunidades de microorganismos en los suelos estudiados, observando en las muestras impactadas una variación de dichas comunidades comparadas con las no contaminadas. Se encontraron 7 colonias de bacterias representativas con un 33,33% de Bacilos Gram-positivos, 66,67% de Bacilos Gram-negativos y 0% de Cocos para las muestras impactadas y para las muestras control 50% de Gram-positivos y 50% de Gram-negativos. Para los hongos se aislaron 8 colonias y se identificaron dos géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*. En el caso de los microorganismos fijadores de nitrógeno se aislaron dos colonias tanto en las muestras impactadas como en los controles; para el caso de los microorganismos productores de amilasa se aislaron 5 colonias en las muestras impactadas y para las muestras control se aislaron tres; en el caso de los microorganismos

productores de celulasa se aisló una sola colonia tanto para las muestras impactadas como para las muestras control; y por último, para los microorganismos productores de proteasa se encontró también una sola colonia. Se determinó el índice de Shannon como parámetro de diversidad encontrando que fue mayor la diversidad de microorganismos en las muestras control con respecto a las muestras impactadas. Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson y se demostró que existe una relación directa entre el porcentaje de materia orgánica en los suelos y las cargas fúngica, de microorganismos fijadores de nitrógeno, de microorganismos productores de amilasa y de microorganismos productores de celulasa con valores de (0,78), (0,55), (0,44), y (0,49) respectivamente. Se demostró que bajo una determinada contaminación con desechos urbanos, algunas familias microbianas, tanto de hongos como bacterias, pueden adaptarse a este perturbador agente y otras no y por último, se observó que las bacterias Gram-negativas fueron más resistentes que las Gram-positivas a la presencia del contaminante.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS Y HONGOS EN SUELOS IMPACTADOS CON DESECHOS URBANOS PROVENIENTES DEL SECTOR “EL EREIGÜE”, SAN JOAQUÍN EDO. CARABOBO, VENEZUELA

Br. Luis Montaner

ABSTRACT

The everyday activities of human beings involving municipal solid waste can be determinant in the microbial life of the environments where they develop. The aim of this work was to study the diversity of soil microorganisms in the presence and absence of solid waste and pollutants, from the sector “El Ereigüe”, San Joaquín, State Carabobo, Venezuela. It took 18 soil samples which showed the presence of solid waste at a distance of approximately two kilometers control samples. Counting of colony forming units (cfu) was performed in petri dishes using LB agar as a growth medium supplemented with Ciprofloxacina® for the growth of fungi and Fluconazol® for bacterial growth. For nitrogen-fixing microorganisms Burk's medium was used with agar-agar as a gelling agent, for amylase-producing microorganisms used LB agar supplemented with starch for producing cellulases used minimal medium with agar-agar as a gelling agent supplemented with microcrystalline cellulose and protease producers minimal medium with agar-agar supplemented with casein as a gelling agent It was found that municipal solid waste in different ways affect the communities of microorganisms in the soils studied, observed in the samples impacted a change in these communities compared with uncontaminated. 7 were found with bacterial colonies representing 33.33% of Bacillus gram-positive, 66.67% of Bacillus Gram-negative and 0% of Cocos for samples impacted and control samples 50% of Gram-positive and 50% of Gram-negative. For fungi were isolated from 8 colonies and identified two genera *Aspergillus* and *Trichoderma*. In the case of nitrogen-fixing microorganisms were isolated from two colonies for impacted both samples as controls; in the case of amylase producing microorganisms were isolated from 5 colonies in the samples impacted and for control samples and three colonies were isolated; in the case of cellulase-producing microorganisms isolated a single colony both for the impacted samples to control samples and finally, for protease-producing organisms also found a single colony. We determined the Shannon index as a measure of diversity was found that greater diversity of organisms in control samples compared to samples

impacted. We determined the Pearson correlation coefficient and showed that there is a direct relationship between the percentage of organic matter in soil and fungal loads, of nitrogen-fixing microorganisms, microorganisms producing amylase and cellulase producing organisms with values (0,78), (0,55), (0,44), and (0,49) respectively. It was shown that under certain municipal waste contamination, microbial some families, both fungi as bacteria can adapt to this agent and other non-disruptive and finally, it was observed that Gram-negative bacteria were more resistant than Gram-positive to the presence of the contaminant.



INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCION	1
CAPITULO I. Formulación del problema	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Objetivos de la investigación	5
1.2.1. Objetivo general	5
1.2.2. Objetivos específicos	6
1.3. Justificación	6
CAPITULO II. Marco teórico	9
2.1. Antecedentes	9
2.2. Bases teóricas	12
2.2.1. El suelo	12
2.2.2. Suelo contaminado	13
2.2.3. Suelo como hábitat para los microorganismos	14
2.2.4. Microorganismos fijadores de nitrógeno	17
2.2.5. Suelos contaminados y microorganismos	18
2.2.6. Aislamiento de cultivos puros	19
2.2.6.1. Siembra en placas por extensión	19
2.2.6.2. Siembra en estrías	20
2.2.6.3. Siembra en profundidad	20
CAPITULO III. Marco metodológico	21
3.1. Muestreo y preparación de las muestras	21
3.2. Caracterización fisicoquímica del suelo	23
3.3. Conteo de la carga microbiana (hongos y bacterias)	23
3.4. Cuantificación de la carga de microorganismos fijadores de nitrógeno	24



3.5. Aislamiento de microorganismos representativos de cada una de las muestras (bacterias, hongos, microorganismos fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, celulasa y productores de proteasa)	25
3.6. Caracterización macro y micromorfológica de las colonias	26
3.7. Determinación cualitativa de la presencia de amilasas, proteasas y celulasas en los clones bacterianos	26
3.8. Determinación del índice de Shannon	27
3.9. Correlación entre la carga bacteriana, fúngica, microorganismos fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, productores de celulasa y microorganismos productores de proteasa con las propiedades fisicoquímicas del suelo	27
CAPITULO IV. Resultados	28
4.1. Caracterización fisicoquímica del suelo	28
4.2. Carga bacteriana, fúngica, microorganismos fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, productores de celulasa y productores de proteasa, índice de Shannon y correlación de Pearson	29
4.3. Diversidad de las colonias bacterianas, fúngicas, fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, productores de celulasa y productores de proteasa	33
CAPITULO V. Discusión de resultados	38
CAPITULO VI. Conclusiones y recomendaciones	43
6.1. Conclusiones	43
6.2. Recomendaciones	44



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
APENDICE	51
Apéndice A. Macro y micromorfología microbiana	51
Apéndice A-1. Metodología para realizar la Morfología de las colonias microbianas	51
Apéndice A-2. Descripción del método de tinción de Gram	52
Apéndice A-3. Soluciones empleadas para la tinción de Gram	53
Apéndice B. Fotos tomadas de algunas colonias de bacterias aisladas	54
Apéndice B-1. Fotos tomadas de algunas pruebas positivas para detectar microorganismos productores de amilasa	55
Apéndice C. Conidióforos	56
Apéndice D. Índice de Shannon	57
Apéndice E. Coeficiente de correlación de Pearson	58
Apéndice F. Preparación de medios de cultivo	59
Apéndice F-1. Preparación de medio de cultivo agar LB	59
Apéndice F-2. Preparación de medio mínimo con caseína	59
Apéndice F-3. Preparación del medio de cultivo Agar celulosa Microcristalina	60
Apéndice G. Morfología de las colonias bacterianas	61
Apéndice H. Macromorfología de las colonias fúngicas	62

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla N° 01. Coordenadas de las muestras tomadas.	22
Tabla N° 02. Metodología empleada para la caracterización fisicoquímica de las muestras.	23
Tabla N° 03. Cantidad en gramo por litro de las sales que conforman el medio Burk's.	25
Tabla N° 04. Parámetros fisicoquímicos del suelo en estudio.	28
Tabla N° 05. Promedio de los logaritmo de las ufc/g de suelo de cada tipo de microorganismo estudiado.	30
Tabla N° 06. Promedio de los logaritmo de las ufc/g de suelo de microorganismos productores de amilasas, productores de celulasas y productores de proteasas.	31
Tabla N° 07. Coeficiente lineal de Pearson para las variables seleccionadas.	33
Tabla N° 08. Número de colonias aisladas por muestra.	34
Tabla N° 09. Morfología microscópica de las colonias de bacterias aisladas.	35
Tabla F-1. Preparación de la solución A (10X)	59
Tabla F-2. Preparación de la solución B (100X)	59
Tabla G-1. Macromorfología y micromorfología de las colonias bacterianas.	61
Tabla H-1. Macromorfología y micromorfología de las colonias fúngicas.	62

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura N° 01. Horizontes del suelo.	13
Figura N° 02. Ciclo del Nitrógeno.	18
Figura N° 03. Índice de diversidad de Shannon obtenido para cada muestra en estudio.	32
Figura N° 04. Micrografía de los microorganismos aislados.	35
Figura N° 05. Placas de crecimiento de hongos.	36
Figura N° 06. Vista microscópica de las colonias de hongos identificadas.	37
Figura A-1. Morfología de colonias bacterianas.	51
Figura N° A-2. Resumen de la tinción de Gram.	52
Figura B-1. Colonia S5-1.	54
Figura B-2. Colonia C2-1.	54
Figura B-3. Colonia R1-1.	54
Figura B-4. Colonia S3-1.	54
Figura B-5. Colonia S3-2.	54
Figura B-6. Colonia R3-1.	54
Figura B-7. Pruebas positivas de microorganismos productores de amilasa.	55
Figura C-1. Conidióforos de los hongos <i>Aspergillus</i> y <i>Trichoderma</i> .	56

INTRODUCCIÓN

El suelo es generalmente un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos y en las partículas que lo forman se desarrollan microcolonias. En esos hábitats, los microorganismos son por lo general mucho más abundantes que en otros de agua dulce o marinos (Mishustin, citado en Atlas y Bartha, 2002). Típicamente, en los hábitats del suelo se encuentran de 10^6 a 10^9 bacterias por gramo de suelo. Los microorganismos aislados del suelo comprenden virus, bacterias, hongos, algas y protozoos (Atlas y Bratha, 2002).

La presencia de contaminantes en el suelo se refleja de forma directa sobre la vegetación induciendo su degradación, la reducción del número de especies presentes en ese suelo, y más frecuentemente la acumulación de contaminantes en las plantas, sin generar daños notables en éstas; cuando estas sustancias son bioacumulables el riesgo se amplifica al incrementarse las concentraciones de contaminantes a medida que ascendemos en la cadena trófica, en cuya cima se encuentra el hombre (Lenoir, G. y col, 2004).

La Agencia de Medio Ambiente de EE.UU. (USEPA) ha analizado hasta 200 compuestos diferentes presentes en los lixiviados en los vertederos de residuos sólidos urbanos. Algunos como cloruro de vinilo, cloruro de metilo, tetracloruro de carbono, clorobencenos (de los que destaca el hexaclorobenceno, por su toxicidad) y arsénico son sustancias cancerígenas. Al igual que el resto de las sustancias organocloradas, son persistentes y bioacumulativas en todos los eslabones de la cadena trófica.

En el siguiente proyecto se propone estudiar la influencia de la contaminación con desechos urbanos sobre la diversidad de microorganismos cultivables del suelo en el sector "El Erigüe", San Joaquín Edo. Carabobo, Venezuela, el cual fue un vertedero urbano durante más de cuarenta años.

CAPÍTULO I: Formulación del problema

1.1 Planteamiento del problema

Teóricamente la diversidad de especies presentes en el suelo puede ser un indicador de los efectos de la contaminación, en particular la aparición de microorganismos resistentes a ésta en una comunidad, lo cual puede ser de utilidad al momento de decidir por un indicador biológico de impacto. Según Van y Doelman (1997) “los microorganismos resistentes a los contaminantes presentes en su hábitat, suelo en este caso, normalmente fracasan en realizar algunas de sus funciones ecológicas específicas”.

La contaminación del suelo consiste en una situación que puede provocar 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 mismo y que modifican negativamente sus propiedades.

La zona en estudio será un vertedero de aproximadamente 14 hectáreas, que por más de 40 años estuvo causando problemas ambientales a la comunidad El Ereigüe y las poblaciones aledañas a este sector, en San Joaquín, Edo. Carabobo. Dicho vertedero fue cerrado y saneado en el año 2008 por el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente para convertirlo en un parque, bosque y caminerías para la recreación de los habitantes de la zona.

Según información del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente los acuíferos cercanos al vertedero de basura fueron impactados desde la superficie por el percolado de fluidos contaminantes a través del suelo; Hidrocentro analizó el contenido de metales pesados

en una laguna de la zona donde se encontró valores fuera de la normativa ambiental.

La toxicidad de ciertos metales pesados, elementos traza y demás compuestos orgánicos e inorgánicos para las plantas y los animales que los consumen hace necesario que se realicen estudios a través del tiempo para evitar cualquier riesgo ambiental mayor que el que se pretende corregir (McBride, 1995).

La biomasa microbiana es el componente más activo del suelo, forma parte del "pool" de la materia orgánica y cumple una función muy importante en el humus, ya que interviene en los procesos de mineralización de nutrientes (Duchafour, 1984), una vez muertos ponen a disposición de otros microorganismos y de las plantas los nutrientes contenidos en los restos microbianos (Jenkinson y Ladd, 1981) y, por otro lado, también participan en la inmovilización. Así, los ciclos de algunos nutrientes mayoritarios, como el carbono, demuestran que la biomasa microbiana es clave en la dinámica de los nutrientes esenciales en el sistema edáfico; por ello, algunos autores afirman que la biomasa microbiana y su actividad en el suelo puede ser empleada como índice de comparación entre sistemas naturales o como indicador de las variaciones sufridas en el equilibrio de un suelo debido a la presencia de agentes nocivos o su manejo productivo (Doran *et al.*, 1994). Es decir, que los parámetros microbiológicos, y por lo tanto bioquímicos, sirven para indicar posibles cambios netos en el equilibrio del suelo que no podrían detectarse con métodos tradicionales, usando propiedades físicas o químicas como indicadores (Brookes, 1985; Doran *et al.*, 1994; García y Hernández, 2000).

Algunos autores (Nannipieri, 1984; Brookes, 1985; Doran *et al.*, 1994) recomiendan indicadores sencillos de medir y de interpretar. Los más comunes que se utilizan son, entre otros, la biomasa microbiana, la respiración del suelo y las relaciones con la materia orgánica y el estado

fisiológico del suelo, donde se ve involucrada la energía en los procesos orgánicos. En cuanto a la biomasa microbiana, este indicador expresa la cantidad de microflora presente en el suelo a través de la extracción del carbono microbiano. El mismo se ve afectado por la agroclimatología que sufren las muestras *in situ*, es decir la humedad, el calor, la biodiversidad de residuos orgánicos al ecosistema y por sustancias agresivas a la actividad microbiana.

Así, los parámetros microbiológicos aportan información relativa a la actividad metabólica que se halla en el suelo, pues son los que mantienen una mayor sensibilidad frente a procesos no deseables tales como la contaminación o el mal manejo. Es por ello que los efectos de prácticas agrícolas, así como los producidos por fertilizantes y diferentes tipos de contaminantes, pueden ser evaluados a partir de las determinaciones de la biomasa microbiana, su actividad metabólica y el conteo de las poblaciones microbianas más importantes de la microflora del suelo (Acuña y col. 2006).

Por lo anteriormente expuesto se propone evaluar la diversidad microbiana como indicador de la salud de los suelos en el antiguo vertedero ubicado en el sector El Ereigüe, San Joaquín, estado Carabobo.

1.2 Objetivos de la investigación

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la diversidad microbiana de organismos cultivables en suelos impactados con desechos urbanos del sector “El Ereigüe”, San Joaquín Edo. Carabobo, Venezuela.

1.2.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la carga bacteriana y fúngica cultivable (ufc/g suelo) presente en las muestras de suelo.
- Cuantificar la carga de microorganismos cultivables fijadores de nitrógeno, productores de amilasas, proteasas y celulasas (ufc/g suelo) en las muestras a estudiar.
- Seleccionar y aislar algunas colonias bacterianas y fúngicas que presenten características particulares.
- Caracterizar macro y micro morfológicamente las colonias de microorganismos que sean aisladas.
- Determinar el índice de Shannon como estimación de la diversidad microbiana en los suelos estudiados.
- Realizar un análisis estadístico que permita analizar el posible efecto de la contaminación con desechos urbanos sobre las comunidades microbianas presentes en el suelo.

1.3. Justificación

La gestión de residuos urbanos comprende la recogida, almacenamiento, transporte, valorización y eliminación (o transformación) de los mismos, siendo también considerada como parte de la gestión la vigilancia de las actividades citadas, además de la vigilancia ejercida sobre los lugares de alojamiento de residuos tras su clausura. La etapa final de la gestión de los residuos tiene tres variantes posibles dependiendo de la naturaleza de los componentes de los residuos y de las posibilidades de la región en la que estos sean tratados. Por lo tanto, los componentes de los residuos

podrán ser transformados con la finalidad de obtener nuevos productos con otras aplicaciones (compostaje y biometanización), valorizados energéticamente con el único propósito de convertirlos en combustible con el que se pueda generar energía (gasificación, hidrogenación, pirólisis, oxidación y, en algunos casos, la incineración) o eliminarlos.

También cabe destacar que los residuos urbanos son a su vez generadores de contaminantes atmosféricos, acuáticos y terrestres (Garrido de las Heras, 1998). Cuando se realiza un estudio de evaluación o de caracterización de un suelo contaminado con desechos urbanos, se determinan diversos parámetros físicos, químicos y biológicos. Estos parámetros pueden dar idea de cuanto y como esos contaminantes afectaron el sistema de vida del suelo (Oropeza, 2010).

El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). También encontramos virus y bacteriófagos. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas y también contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa que lo conforman. Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros elementos; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, entre otros (Nogales, 2005).

Debido a la degradación natural que sucede en los suelos ante la presencia de contaminante, y la participación en este proceso que realizan los microorganismos, en particular, las bacterias, se han realizado estudios con respecto a la diversidad microbiana presente en un

sitio antes, durante y después de su descontaminación (Abed y col., 2002).

Es necesario conocer la influencia de la contaminación con desechos urbanos sobre la diversidad microbiológica del suelo, ya que los organismos suministran los elementos y compuestos orgánicos e inorgánicos nutricionales que mantienen la buena salud del suelo. Por tanto se plantea el estudio de los microorganismos cultivables en el suelo del antiguo vertedero ubicado en el sector "El Ereigüe" San Joaquín, estado Carabobo. Este estudio ayudará a determinar la diferencia en la diversidad de microorganismos existentes en los suelos con presencia y ausencia de desechos urbanos como contaminantes.

CAPÍTULO II: Marco teórico

2.1. Antecedentes

A continuación se presentan una serie de trabajos, que sirven como base para tomar las metodologías y procedimientos que serán necesarios durante este proyecto.

- **Diversidad microbiológica de bacterias y hongos en suelos impactados con petróleo provenientes de Yaracal, estado Falcón, Venezuela.**

Oropeza, J. (2010) estudió la diversidad de microorganismos existentes en suelos con presencia y ausencia de petróleo como contaminante, provenientes del Mene de San Lorenzo, Yaracal, estado Falcón, Venezuela. Extrajo cuatro muestras de pozos donde se observó la emanación de petróleo y a una distancia de 30 metros tomó muestras control. Realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (ufc) en placas utilizando agar LB como medio de crecimiento, complementado con Ciprofloxacina® para el crecimiento de hongos y con Fluconazol® para el crecimiento de bacterias. Para los microorganismos fijadores de nitrógeno utilizó medio Burk's con agar-agar como gelificante. Encontró que el petróleo afectó de manera diversa a las comunidades de microorganismos en los suelos estudiados, observando en las muestras impactadas con petróleo una disminución de dichas comunidades comparadas con las no contaminadas. Encontró 28 colonias bacterianas representativas con un 60% de Bacilos Gram-positivos 40% Cocos Gram-positivos y 0% de Bacilos Gram-negativos para las muestras impactadas. Para los hongos aisló 17 colonias e identificó dos géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En el caso de los microorganismos fijadores de nitrógeno encontró 10 colonias con un 44,44% de Bacilos Gram-positivos, 33,33% de cocos Gram-positivos y 22,22% de cocos Gram-negativos en las

muestras control, mientras que en las muestras impactadas solo una colonia identificada como cocos Gram-negativos. Correlacionó a los organismos fijadores de nitrógeno con las bacterias y determinó que tenían capacidades microaeróbicas. Demostró que bajo una determinada concentración de petróleo, algunas familias microbianas pueden adaptarse a este agente perturbador y que muchas otras no. Las bacterias Gram-negativas y los hongos fueron más sensibles a la presencia del contaminante que las bacterias Gram-positivas. Por último mencionó que es necesario hacer estudios empleando técnicas de biología molecular, para establecer un posible biotratamiento con microorganismos autóctonos.

- **Evaluación de la diversidad microbiana en sistemas de cultivo con base en vegetales en la agricultura ecológica**

Srivasta y col. (2007), estudiaron el efecto de los hongos micorrizicos arbusculares (AMF) y *Pseudomonas* como inoculantes microbianos en los sistemas de cultivo con base en vegetales en la agricultura ecológica. Ellos tomaron tres cosechas del sistema de rotación de okra, arveja y frijol durante un año. Los inoculantes fueron *Glomus intraradices*, un hongo micorriza arbuscular, y cuatro cepas de *Pseudomonas fluorescens* por separado y en combinación. Ningún químico o abono orgánico se agregó durante dos rotaciones de las hortalizas elegidas. Observaron un aumento significativo del rendimiento en las parcelas inoculadas respecto al control y la diversidad microbiana cultivable aumentó en comparación con el inicio del experimento. Evaluaron la diversidad microbiana por electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*) confirmando la diversidad microbiana total. La diversidad funcional evaluada en base a productores de celulasa, xilanasas, amilasa, proteasa y solubilizadores de fósforo (P), mostraron que los inoculantes utilizados beneficiosamente mantenían la salud del suelo. Los resultados indicaron que la reserva genética microbiana,

especialmente la de los ayudantes clave para el mantenimiento de la salud del suelo, residen en las cercanías de las raíces, y estos fueron afectados positivamente por el uso de *Pseudomonas* y AMF. Concluyeron que en las prácticas de la gestión de la agricultura, agentes biológicos y residuos de cultivos inoculados incrementaban el rendimiento de los vegetales.

Esta investigación ayuda a entender como es el proceso de estimación de la diversidad microbiana total de un suelo y como evaluar esta diversidad en función de las bacterias y hongos productores de celulasa, xilanas, amilasa y proteasa; parámetros importantes para este estudio, ya que ofrecen información de cómo ha sido afectado el suelo contaminado.

- **La bacteria *Halomonas maura* moderadamente halofílica es un diazotrófo de vida libre**

Argandoña y col. (2005) estudiaron la fijación de nitrógeno por una bacteria halófila, *Halomonas maura*, que vive en suelos salinos y sintetiza un exopolisacárido conocido como Maurano. La cepa S-31T creció en un medio libre de nitrógeno con atmósfera de N₂. El ensayo de reducción de acetileno fue positivo en condiciones específicas. Ellos identificaron el gen nifH en esta cepa, utilizando oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de secuencias altamente conservadas de un gen, obtenidos de la alineación de un gran número de secuencias del gen nifH de diferentes microorganismos. Sus resultados los llevaron a la conclusión de que *H. maura* es capaz de fijar el nitrógeno en condiciones microaeróbicas.

Esta investigación ayuda a conocer los parámetros necesarios para evaluar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en un determinado suelo. Estas bacterias son importantes dentro del ciclo del

nitrógeno y conservan la fertilidad del suelo y ayudan al crecimiento de plantas superiores.

1.2. Bases teóricas

2.2.1 Suelo

El suelo es un recurso natural definido generalmente como la capa superior de la corteza terrestre, está formado por partículas de minerales, materia orgánica, agua, aire y allí nacen y se desarrollan miles de seres vivos, desde microorganismos hasta plantas y animales superiores (COM, 2002). Los suelos se clasifican en distintos tipos de acuerdo al porcentaje de cada uno de los componentes mencionados, según el Instituto Geográfico de Venezuela "Simón Bolívar", en Venezuela existen 9 tipos de suelos, con características dependientes de la cantidad de materia orgánica, cantidad de arcilla, fertilidad, minerales, meteorización, entre otros (IGVSB, 2003).

El suelo se forma a partir de las rocas mediante un proceso complejo en el que intervienen fuerzas físicas, químicas y biológicas, que primero reducen la roca a regolito (fragmentos de roca) y después a suelo. Los cinco principales factores que participan en la formación del suelo son el material parental, el clima, la topografía, la actividad biológica y el tiempo. El suelo contiene comunidades microbianas de gran diversidad y, por definición, soporta el crecimiento de las plantas. Los microorganismos contribuyen en gran manera a la fertilidad del suelo, es decir, a su capacidad de sostener el crecimiento vegetal (Metting, 1993).

Los suelos se constituyen en capas llamadas horizontes. Cada horizonte difiere en una o más características del superior o del inferior. Usualmente se reconocen cinco tipos de horizontes. En la figura N° 01 se observan los horizontes de un suelo.

La materia orgánica del suelo, procede de los restos de plantas, animales y microorganismos (Bear, 1964), es uno de los componentes centrales del suelo y juega un rol muy importante, pues se encarga de mantener las funciones del suelo, en particular la capacidad de resistir a la erosión y de mantener la fertilidad del suelo. Además asegura la capacidad tampón y de adhesión que posee el suelo, primordial para limpiar la difusión de contaminantes.

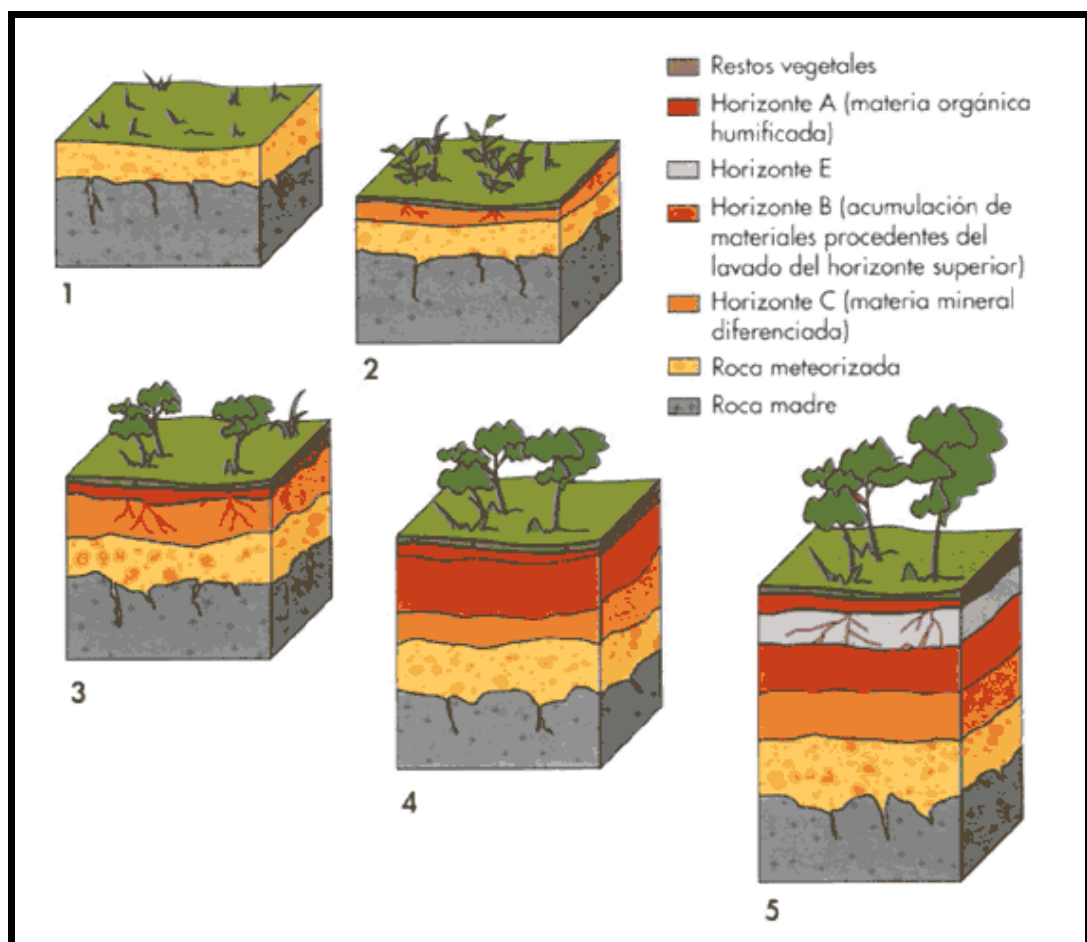


Figura Nº 01. Horizontes del suelo. (Pulido y col., 2002).

2.2.2. Suelo contaminado

Cuando un suelo ha sido continuamente utilizado, se deteriora, se degrada, y deja de poseer y aportar sus cualidades iniciales. Se puede

decir que un suelo está contaminado, cuando las características físicas, químicas o biológicas originales han sido alteradas de manera negativa, debido a la presencia de componentes de carácter peligroso o dañino para el ecosistema (Fers, 2010).

Existen diferentes tipos de contaminación de los suelos como son: *superficial*, que deriva de una acumulación de residuos vertidos accidental o voluntariamente en el terreno; *subterránea*, que corresponde al caso del enterramiento de los residuos; *vertido no alevoso*, cuando el origen de la contaminación es fortuita o por negligencias en la gestión de los contaminantes; *contaminación difusa*, en la que no existe un foco concreto de contaminación del suelo sino que se manifiesta de forma extensiva y la *contaminación puntual*, localizada con un núcleo emisor desde el que pueden movilizarse los contaminantes a otros elementos del medio (atmósfera, aguas superficiales y subterráneas). (Millán y col. 2005).

2.4.3. Suelo como hábitat para los microorganismos

Se puede pensar en el suelo como un medio de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. El tipo y composición de la materia mineral viene dado por las características de las rocas del subsuelo, así como de los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación. La fracción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación, retención de agua, entre otros. La materia orgánica proviene de la acción de los diferentes organismos vivos del suelo y puede variar tanto en composición como en cantidad, especialmente en función del tipo de vegetación que exista. El resto del volumen del suelo está habitualmente constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica. Podemos encontrar que la atmósfera del

suelo se halla enriquecida en dióxido de carbono y empobrecida en oxígeno, como consecuencia de la respiración aeróbica de raíces de plantas, animales y microorganismos. Sin embargo, cuando se producen condiciones de anaerobiosis aparecen en la atmósfera del suelo otros gases como óxido nitroso, nitrógeno gaseoso y metano, resultantes de actividad respiratoria anaeróbica (Nogales, 2005).

Este sistema complicado que compone el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, aloja una riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. El suelo es un ambiente muy favorable para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). También se pueden encontrar virus y bacteriófagos.

Las bacterias son un indicador que refleja la población potencial de microorganismos en un determinado suelo, especialmente aquellas que ocupan diferentes nichos o hábitats en forma saprofitica. La función básica de las bacterias es la descomposición y mineralización de los residuos orgánicos, de donde obtienen su fuente energética y alimenticia. Las bacterias liberan al medio en el que se encuentran a través de su metabolismo, especialmente en el suelo, sustancias tales como enzimas, proteínas, reguladores de crecimiento, metabolitos y algunos nutrientes. Los beneficios de las bacterias para los cultivos se relacionan con un incremento en la cantidad de raíces y un aporte importante de elementos básicos para el desarrollo y producción (Acuña y col., 2006).

Las bacterias poseen una numerosa variedad de funciones en el suelo. La descomposición de animales, plantas y residuos microbianos es llevada a cabo por bacterias heterótrofas. Estas bacterias tienden a ser los miembros más numerosos de la comunidad microbiana del suelo y su selectividad de los sustratos varía considerablemente de una especie de

bacteria a otra. Las bacterias quimioautótrofas del suelo, juegan un papel importante en los ciclos de nutrimentos (Alexander, 1980).

La composición de la población bacteriana del suelo frecuentemente puede indicar las condiciones físicas y químicas del mismo. La presencia activa de una bacteria como *Clostridium*, es indicativa de condiciones anaeróbicas, ya sea en el suelo en su totalidad o bien en los micrositos. Como ejemplo de este tipo de bacterias tenemos: *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* (Bautista y col., 2004).

Los hongos son los organismos más abundantes en biomasa microbiana del suelo. Los hongos poseen un amplio intervalo de funciones en el suelo, incluyendo su papel como simbioses de plantas, patógenos de plantas y animales, oligótrofos, e incluso carnívoros, sin embargo su papel más importante en el suelo desde el punto de vista ecológico, es la descomposición de la materia orgánica desde los azúcares simples y aminoácidos hasta polímeros muy resistentes como la lignina y complejos de ácidos húmicos del suelo. Gracias a su gran tolerancia a la acidez, comparado con las bacterias heterótrofas, la descomposición de la materia orgánica en suelos ácidos en su mayoría es realizada por hongos. El papel de los hongos como simbioses, específicamente en micorrizas, es de gran importancia para el desarrollo de plantas, por su papel en la toma de nutrientes, resistencia a enfermedades y relaciones hídricas favorables. Dentro de los hongos representativos tenemos como ejemplos: *Glomus*, *Fusarium*, *Gigaspora*, *Trichoderma*, *Pythium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Alexander, 1980).

Además de bacterias y hongos, en el suelo existen otros tipos de microorganismos, tales como los protozoarios, algas, entre otros. Sin embargo, en nuestro estudio nos centraremos solo en bacterias y hongos.

2.2.4. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son componentes muy importantes del suelo. Para desarrollar la fertilidad del suelo, debe aumentar el contenido de nitrógeno. En las condiciones medioambientales adecuadas, las bacterias fijadoras de nitrógeno producen enzimas que toman el nitrógeno en su forma gaseosa de la atmósfera, y lo fijan dentro de la biomasa bacteriana. Si las bacterias satisfacen sus necesidades de nitrógeno, entonces, el nitrógeno pasa a la planta, y pueden observarse niveles elevados de proteína en ésta. El nitrógeno fijado no se libera al suelo hasta que muere parte de la planta, o se exuda al suelo en la rizósfera. Se dan tres grandes divisiones de bacterias fijadoras de nitrógeno: las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas, las bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas y las bacterias fijadoras de nitrógeno libres (Andrade y col, 2009). Las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas, tales como el *Rhizobium*, se dan en las leguminosas; estas bacterias forman nódulos en las raíces de las plantas y estos nódulos son fáciles de contar. Las bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas ocupan los espacios entre las células de las raíces de la planta, y no alteran la arquitectura de la raíz en absoluto; y las bacterias fijadoras de nitrógeno libres son especies que habitan en la rizósfera, consumiendo los exudados de azúcares que la planta libera por sus raíces, utilizando esta fuente de energía como combustible para realizar la conversión de nitrógeno gaseoso no disponible para la planta en nitrógeno libre, de este tipo se conocen algunas como *Azotobacter* y *Pseudomonas*, entre otras (Lewandowski y col, 2000).

Dentro de los principales organismos fijadores de Nitrógeno se encuentran bacterias como *Azotobacter*, *Mycobacterium flavum*, *Azospirillum lipoferum*, *Methylococcus*, *Thiobacillus* y *Rhizobium*, entre otras (Contreras, 2005).

En la figura N° 02 se presenta el “Ciclo del Nitrógeno”:

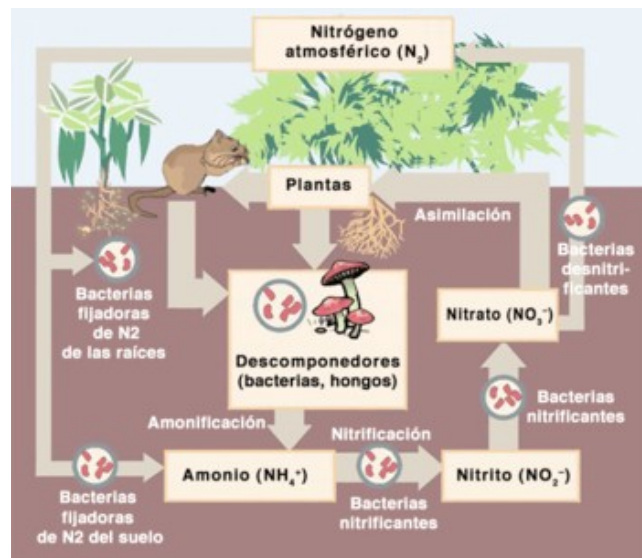


Figura N° 02. Ciclo del Nitrógeno. (Smil, 2000).

2.2.5. Suelos contaminados y microorganismos

Las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados tienden a estar dominadas por aquellas bacterias que pueden sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente siendo capaces de utilizar al contaminante para crecer; en este sentido el contaminante “desbalancea”, mas que toxifica, las comunidades ecológicas del suelo (Contreras, P., 2005).

Estudios de Van Beelen y Doelman (1997) sobre toxicidad, han expuesto que algunos grupos de microorganismos tienen la capacidad de ser más resistentes a contaminantes que otros, por ejemplo las bacterias Gram negativas son más resistentes en comparación a las Gram positivas, en particular ante la presencia de metales.

Entre los microorganismos que normalmente se encuentran en un suelo contaminado, con hidrocarburos, está la especie *Pseudomonas* en particular *P. putida*. Esta bacteria pertenece a la subclase proteobacteria

(Nelson y col., 2002), específicamente según Yu y col., (2000) corresponde a una γ proteobacteriana y su temperatura óptima de crecimiento está en el intervalo de 15 a 22 °C, pero pueden crecer a intervalos menores entre 4 y 22 °C. *Pseudomonas* es una bacteria propia del suelo, y algunos linajes de esta especie han sido considerados como potencial bacteria para aplicaciones biotecnológicas como es la biorremediación de suelos.

2.2.6. Aislamiento de cultivos puros

En los hábitats naturales, los microorganismos crecen en poblaciones mixtas y complejas, que contienen varias especies. Esto representa un problema para el científico porque no se puede estudiar adecuadamente un único tipo de microorganismo en un medio mixto. Se necesita un cultivo puro, población de células que procede de una única célula, para caracterizar una especie individual. Existen varias formas de obtener cultivos puros, según Prescott y col. (2004) estas son siembra en placas por extensión, en estrías y en profundidad.

2.2.6.1. Siembra en placas por extensión

Si se extiende una mezcla de células sobre una superficie de agar, cada célula aislada se multiplicará formando una colonia independiente, formación o agrupación macroscópicamente visible de microorganismos sobre un medio sólido; generalmente cada colonia representa un cultivo puro. La siembra por extensión es una forma directa y fácil de conseguir este resultado. Se pasa un volumen pequeño de una mezcla microbiana diluida, conteniendo no más de un centenar de células, al centro de una placa de agar y se extiende uniformemente sobre la superficie con una varilla acodada de vidrio estéril.

2.2.6.2. Siembra en estrías

Las colonias aisladas se pueden obtener también mediante siembra en estrías. Se inocula la mezcla microbiana sobre un extremo de la placa de agar con un asa de siembra o un hisopo, y se extiende formando estrías sobre la superficie en uno o varios sentidos. Las células individuales se irán desprendiendo del asa al frotarla sobre la superficie y desarrollarán colonias aisladas.

2.2.6.3. Siembra en profundidad

La siembra en profundidad que se emplea frecuentemente con bacterias y hongos, puede también generar colonias aisladas. La muestra original se diluye varias veces para reducir la población microbiana lo suficiente, con el fin de obtener colonias separadas cuando se siembren. A continuación, se mezclan volúmenes pequeños de las muestras diluidas con agar líquido, que se ha temperado hasta aproximadamente 45 °C, y la mezcla se vierte inmediatamente en placas de cultivo estériles. La mayoría de las bacterias y hongos no se destruyen a una exposición breve al agar temperado. Por motivos estadísticos y de fiabilidad, únicamente se deberán contar las placas conteniendo entre 30 y 300 colonias.

CAPITULO III: Marco metodológico

3.1 Muestreo y preparación de las muestras

Se realizó una toma de muestras de suelo, empleando el método al azar, en el antiguo vertedero ubicado en el sector “El Ereigüe”, San Joaquín Edo. Carabobo, Venezuela.

Las muestras se recolectaron utilizando un barreno, en bolsas plásticas (polietileno) esterilizadas, muestras (aproximadamente de 4 Kg), tomadas entre 0-40 cm de profundidad. Se tomaron 18 muestras en la zona impactada, enumeradas del 1 al 10, la mayoría presentó aproximadamente de los 0 hasta los 15cm de profundidad una especie de “relleno” que fue adicionado al antiguo vertedero en el momento en que fue clausurado, por este motivo, de ahora en adelante al nombrar una muestra con la letra “R” se estará haciendo referencia a que fue recolectada entre los 0 y 15cm de la superficie, compuesta principalmente del relleno en cuestión, y cuando se nombre una muestra con la letra “S” se estará haciendo referencia a que la muestra fue tomada directamente del suelo, es decir, que no posee relleno. Solo dos muestras no presentaron esta especie de relleno, razón por la cual resultaron ser 18 muestras impactadas. Adicionalmente, siguiendo la misma metodología, se tomaron 2 muestras libre de contaminación cercanas al vertedero (muestras control), sumando un total de 20 muestras; las muestras control serán denotadas con la letra “C”. En la tabla N° 01 se detallan las coordenadas correspondientes a cada muestra.

Tabla N° 01. Coordenadas de las muestras tomadas

Muestra	Coordenadas	
R1 - S1	10°09'50"N	67°52'10"W
R2 - S2	10°10'7"N	67°52'47"W
R3 - S3	10°9'55"N	67°52'47"W
R4 - S4	10°9'44"N	67°52'47"W
S5	10°16'58"N	67°48'27"W
R6 - S6	10°16'55"N	67°48'27"W
R7 - S7	10°16'59"N	67°48'34"W
R8 - S8	10°17'0"N	67°48'32"W
R9 - S9	10°16'54"N	67°48'32"W
S10	10°17'3"N	67°48'37"W
C1 - C2	10°16'57"N	67°48'30"W

Para la medición de los parámetros fisicoquímicos (pH, conductividad eléctrica, contenido y retención de humedad, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico), las muestras de suelo se secaron al aire por 72 horas, luego se realizó la molienda y se pasaron por un tamiz de 2 mm. Se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes con tapa.

Para el análisis microbiológico las muestras frescas (almacenadas a 4°C entre las 24 o 48 horas después de la toma de muestras) se extendieron sobre un plástico limpio y seco, se les retiró el material grueso (piedras, hojas, tallos y raíces), luego se pasaron por el tamiz estéril de 2 mm. Una vez tamizadas las muestras se almacenaron en recipientes estériles con tapa a -20°C (Frostergard y col., 1993; Matsushita y col., 2007) hasta su análisis.

3.2 Caracterización fisicoquímica del suelo

A cada una de las muestras de suelo que se tomaron, se le analizaron parámetros fisicoquímicos de acuerdo a la metodología resumida en la tabla N° 02.

Tabla N° 02. Metodología empleada para la caracterización fisicoquímica de las muestras.

Parámetro	Método	principio	Técnica	Referencia
Humedad relativa (%)	10g de muestra T= 105°C en 24h	Diferencia de peso luego de la evaporación	Gravimetría	(Jackson, 1970)
Retención de humedad (%)	30g de muestra. Se filtra el agua por 6h	Diferencia de peso	Gravimetría	Citado por: (Jaramillo, 2002)
Conductividad	1 : 2 agua	Medición de la movilidad de los iones	Conductimetría	(Jackson, 1970)
pH	1 : 1 agua y KCl 1M	Mide concentración de protones con un electrodo de vidrio	Potenciometría	(Olarte, 1979)
Carbono orgánico	Walkley-Black modificado	Oxidación del carbono con K ₂ CrO ₄ en medio ácido	Espectrofotometría a 600nm	(Walinga y col., 1992)
CIC-suelo	NH ₄ OAc 1M pH 7	Intercambio catiónico, reacciones ácido-base	Extracción y alcalimetría	(Schollenberger y Simón, 1945)

3.3 Conteo de la carga microbiana (Hongos y bacterias)

La carga microbiana se determinó utilizando un sembrado por profundidad sobre placas de petri. Se tomó 1 gramo de muestra de suelo y se diluyó en 9 ml de una solución salina (NaCl) 0,8% y luego se hicieron diluciones sucesivas de 1/100, 1/1000 y 1/10000. Se tomaron 100 µL de cada una de estas diluciones para el conteo de la carga de bacterias como de hongos (Prescott y col., 2004).

Para realizar el conteo de la carga bacteriana se suplementó medio Agar LB con Fluconazol®, marca Calox, en una proporción 1g/L. Una vez realizada la siembra y que el medio haya gelificado se colocaron las muestras en incubación a 33°C por 24 horas y se efectuó el conteo de las unidades formadoras de colonia para cada dilución. Con respecto de la carga fúngica se utilizó medio Agar LB suplementado con Ciprofloxacina®, marca Genven en una concentración de 1g/L. Las muestras se incubaron a 33°C por 3 días. Todo esto bajo un ambiente estéril y por duplicado.

3.4 Cuantificación de la carga de microorganismos fijadores de nitrógeno

Los microorganismos fijadores de nitrógeno se estudiaron según la metodología de Argandoña y col. (2005). Se tomó 1 gramo de muestra de suelo y se diluyó en 9 ml de una solución salina (NaCl) 0,8% y luego se hicieron diluciones sucesivas de 1/100, 1/1000 y 1/10000. Se tomaron 100 µL de cada una de estas diluciones para el conteo de la carga de fijadores de nitrógeno. Las muestras se incubaron en un medio de crecimiento Burk's, que tuvo una concentración final de 0,8% p/v de las sales de la tabla Nº 03 y utilizando como medio Agar-Agar. Todo esto bajo un ambiente estéril y por duplicado.

Tabla Nº 03. Cantidad en gramo por litro de las sales que conforman el medio Burk's. (Modificado de Argandoña y col., 2005).

Sal	Gramos por litro
-----	------------------

K_2HPO_4	0.64
$K_2H_2PO_4$	0.16
NaCl	7
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.05
Glucosa	8
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.001
$FeSO_4$	0.003

3.5 Aislamiento de microorganismos representativos de cada una de las muestras (Bacterias, Hongos, Microorganismos Fijadores de Nitrógeno, productores de amilasa, productores de celulasa y productores de proteasa)

Una vez realizada la siembra de cada una de las muestras y después de hacer el conteo de las ufc, se procedió a seleccionar colonias, tanto bacterias como hongos, microorganismos fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, celulasa y productores de proteasa para realizar su aislamiento y luego hacer la caracterización macro y micromorfológica. El criterio de selección de estas colonias se hizo de acuerdo a la coloración de las colonias, la forma, el margen, el orden de aparición, la repetitividad en las muestras, parecido y separación entre ellas. Cada colonia fue rotulada con el nombre de la muestra de suelo de la cual se seleccionó, seguida de un número arábigo correspondiente a la colonia. Por ejemplo, la colonia C1-1 corresponde a la colonia número 1 aislada de la muestra de suelo C1 (Control 1).

3.6 Caracterización Macro y Micromorfológica de las colonias

La caracterización macromorfológica de las colonias seleccionadas tanto bacterianas y fúngicas se realizó por simple observación de las placas,

detallando la forma, elevación, margen, color, tono y tamaño. Las tres primeras caracterizaciones se hicieron de acuerdo a la morfología presentada por Prescott y col. (2004), la cual se puede observar en la figura A.1 (Apéndice A).

La caracterización micromorfológica de las bacterias se hizo mediante la tinción de Gram, procedimiento descrito en el Apéndice A.2. Según la observación al microscopio se logró determinar si los microorganismos estudiados son Gram positivos o Gram negativos de acuerdo al color de la tinción y si son bacilos o cocos de acuerdo a la forma.

La caracterización micromorfológica de los hongos se hizo por comparación de los conidióforos vistos a través de un microscopio. En ciertos hongos, el conidióforo es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidias. Se localizan al extremo de hifas las cuales levantan el conidióforo en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia (Prescott y col, 2004).

3.7 Determinación cualitativa de la presencia de amilasas, proteasas y celulasas en los clones bacterianos

Paralelamente a la caracterización morfológica de las colonias se realizó la prueba cualitativa de amilasas, proteasas y celulasas. Esta prueba se realizó a todas las colonias que pudieron ser aisladas y crecieron sobre las placas con agar LB suplementado con almidón para el caso de las amilasas; con agar-agar suplementado con caseína para el caso de las proteasas y por último, sobre placas con agar-agar suplementado con celulosa microcristalina para el caso de las celulasas, (Apéndice F). Para detectar productores de amilasa, la prueba cualitativa consistió en agregar, mediante un gotero, una pequeña cantidad de Lugol (una

solución de yodo 1%- yoduro de potasio 2% en agua destilada) sobre la superficie de crecimiento bacteriano, al observar un halo amarillento se dijo que la prueba fue positiva, cuando la coloración fue azul intenso la prueba resultó negativa (Ver figura B-7). Para el caso de las proteasas y celulasas, la prueba resultó positiva al observar un halo transparente alrededor de cada colonia, por simple observación.

3.81

Determinación del índice de Shannon

Una vez obtenidas las unidades formadoras de colonia (ufc) de cada tipo de microorganismo, se les efectuó el correspondiente tratamiento matemático tomando en cuenta las diluciones, para expresarlas en base al suelo seco como *log (ufc/g ss)*. Con el logaritmo de cada ufc/g suelo se calculó el índice de Shannon (apéndice D) como estimación de la diversidad de bacterias, hongos, organismos fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, proteasa y celulasa.

3.9 Correlación entre la carga bacteriana, fúngica, microorganismos fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, celulasa, proteasa y las propiedades fisicoquímicas del suelo

Para realizar la correlación entre las ufc de bacterias, hongos, fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, productores de celulasa y productores de proteasa con respecto a las propiedades fisicoquímicas del suelo se calculó el coeficiente de Pearson mediante el procedimiento descrito en el apéndice E. Este parámetro estadístico indica si hay correlación entre dos variables de manera directamente proporcional con valores entre 0 y +1, o si la correlación es inversamente proporcional valores entre -1 y 0.

CAPITULO IV: Resultados

4.1. Caracterización fisicoquímica del suelo

Una vez recolectadas las muestras se realizó la caracterización fisicoquímica del suelo de acuerdo a las metodologías citadas en la Tabla N° 02, la cual se puede observar en la Tabla N° 04.

Tabla N° 04. Parámetros fisicoquímicos del suelo en estudio.

Muestra		pH 1:1	Humedad relativa (%)	Retención de humedad (%)	COT (%)	CE (μScm^{-1})	CIC (meq/*100g suelo)
1	R	6,4 ± 0,1	4,69 ± 0,06	31,0 ± 0,9	0,15 ± 0,03	930 ± 38	17 ± 2
	S	6,5 ± 0,1	4,42 ± 0,02	32 ± 3	0,54 ± 0,08	848 ± 16	18 ± 3
2	R	7,2 ± 0,2	7,75 ± 0,09	18,60 ± 0,02	0,02 ± 0,01	540 ± 42	18 ± 1
	S	6,9 ± 0,3	3,9 ± 0,04	41,61 ± 0,08	0,05 ± 0,01	749 ± 136	26 ± 1
3	R	6,4 ± 0,1	3,48 ± 0,09	41,1 ± 2,0	0,182 ± 0,009	350 ± 10	22 ± 5
	S	6,8 ± 0,2	6,95 ± 0,05	53,4 ± 7,4	0,990 ± 0,07	650 ± 35	22 ± 6
4	R	7,1 ± 0,2	5,72 ± 0,60	39,44 ± 0,08	0,22 ± 0,02	225 ± 5	30 ± 1
	S	7,3 ± 0,1	6,02 ± 0,05	38,3 ± 0,7	0,90 ± 0,01	193 ± 5	17,0 ± 0,1
5	S	7,0 ± 0,1	10,70 ± 0,03	27,98 ± 3,27	0,49 ± 0,31	168 ± 1	19,9 ± 7,1
6	R	6,71 ± 0,01	7,09 ± 0,05	26,37 ± 0,99	0,0100 ± 0,0001	1380 ± 16	20,7 ± 0,7
	S	7,18 ± 0,12	8,98 ± 0,04	28,95 ± 3,21	0,074 ± 0,002	1087 ± 14	19,29 ± 1,58
7	R	7,6 ± 0,2	10,03 ± 0,35	41,26 ± 0,37	0,014 ± 0,001	1380 ± 43	41,04 ± 1,42
	S	7,43 ± 0,03	9,64 ± 0,28	32,41 ± 5,76	0,023 ± 0,002	1720 ± 60	49,12 ± 2,04
8	R	7,23 ± 0,03	8,89 ± 0,05	26,86 ± 0,79	0,40 ± 0,01	95 ± 3	45,17 ± 12,84
	S	7,53 ± 0,19	7,05 ± 0,08	28,37 ± 1,27	1,53 ± 0,15	199 ± 4	48,04 ± 0,26
9	R	7,7 ± 0,4	6,45 ± 0,68	69 ± 4	0,44 ± 0,05	189 ± 4	39,2 ± 0,3
	S	7,9 ± 0,1	8,23 ± 1,16	74 ± 3	0,90 ± 0,16	1080 ± 20	38,2 ± 0,3
10	S	6,9 ± 0,1	7,89 ± 1,10	25 ± 1	0,39 ± 0,01	69 ± 10	20,0 ± 0,7
C1	S	7,3 ± 0,1	5,3 ± 0,3	64,50 ± 0,94	2,93 ± 0,94	157 ± 24	27 ± 6
C2	S	7,0 ± 0,2	6,2 ± 0,4	29,6 ± 0,9	0,52 ± 0,05	166 ± 3	29,0 ± 0,6

COT: Carbono Orgánico Total; CE: Conductividad Eléctrica; CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico

4.2. Carga bacteriana, fúngica, microorganismos fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, productores de celulasa y productores de proteasa, índice de Shannon y correlación de Pearson

Al realizar el conteo de las ufc para cada caso y haciendo el tratamiento matemático se obtuvo la carga bacteriana y fúngica para cada una de las muestras expresadas como $\text{Log}(\text{ufc/g de suelo})$, expuestos en la tabla N° 05 observando mayor carga bacteriana con respecto a la de hongos. La carga bacteriana varió entre $4,15 \cdot 10^5$ y $1,42 \cdot 10^6$ ufc/g de suelo para las muestras impactadas y entre $6,57 \cdot 10^5$ y $1,13 \cdot 10^6$ ufc/g de suelo para las muestras control; la carga fúngica varió entre 0 y $7 \cdot 10^4$ ufc/g de suelo para las muestras impactadas y entre $1,37 \cdot 10^5$ y $4,8 \cdot 10^5$ ufc/g de suelo para las muestras control; para los microorganismos fijadores de nitrógeno la carga varió entre $3,75 \cdot 10^4$ y $4,72 \cdot 10^5$ ufc/g de suelo para las muestras impactadas y entre $3,07 \cdot 10^5$ y $7,57 \cdot 10^5$ ufc/g de suelo para las muestras control; para los microorganismos productores de amilasa la carga varió entre 0 y $8,75 \cdot 10^4$ ufc/g de suelo en las muestras impactadas y entre $6,25 \cdot 10^4$ y $9,25 \cdot 10^4$ ufc/g de suelo en las muestras control; la carga de microorganismos productores de celulasa varió entre $1,75 \cdot 10^4$ y $4,6 \cdot 10^5$ ufc/g de suelo en las muestras impactadas y entre $2,57 \cdot 10^5$ y $6,3 \cdot 10^5$ ufc/g de suelo en las muestras control y por último, la carga de microorganismos productores de proteasas varió entre $5 \cdot 10^3$ y $1,25 \cdot 10^5$ ufc/g de suelo en las muestras impactadas y entre $1,45 \cdot 10^5$ y $1,47 \cdot 10^5$ ufc/g de suelo en las muestras control. Se observó que la carga fúngica, de microorganismos fijadores de nitrógeno, de productores de amilasa, productores de celulasa y de productores de proteasa es mayor en las muestras control con respecto a las muestras impactadas.

A través del índice de Shannon H (figura N° 03) se observa la diversidad de especies en cada muestra. En las muestras impactadas con desechos urbanos la diversidad es menor que en las muestras control, al observarse que los valores de H para estas, son superiores a los de las muestras impactadas.

Tabla N° 05. Promedio de los logaritmo de las ufc/g de suelo de hongos, bacterias y microorganismos fijadores de nitrógeno.

		Hongos		Bacterias		Fijadores de N	
		ufc/g s	log(ufc/g s)	ufc/g s	log(ufc/g s)	ufc/g s	log(ufc/g s)
1	R	7*10 ⁴	4,83 ± 0,40	5,25*10 ⁵	5,63 ± 0,31	2,22*10 ⁵	5,28 ± 0,25
	S	5,75*10 ⁴	4,53 ± 0,68	7,17*10 ⁵	5,78 ± 0,30	1,82*10 ⁵	5,37 ± 0,14
2	R	5*10 ³	4 ± 0	1,04*10 ⁶	6,01 ± 0,12	1,4*10 ⁵	5,24 ± 0,17
	S	3*10 ⁴	4,65 ± 0,49	1,19*10 ⁶	5,97 ± 0,36	1,82*10 ⁵	5,23 ± 0,05
3	R	4,5*10 ⁴	4,61 ± 0,53	8,37*10 ⁵	5,92 ± 0,05	3,62*10 ⁵	5,57 ± 0,20
	S	3,75*10 ⁴	4,59 ± 0,36	1,42*10 ⁶	6,06 ± 0,34	3,27*10 ⁵	5,17 ± 0,33
4	R	7,5*10 ³	4,48 ± 0	1,04*10 ⁶	5,87 ± 0,43	3,4*10 ⁵	5,50 ± 0,10
	S	1,25*10 ⁴	4,39 ± 0,12	8,8*10 ⁵	5,87 ± 0,30	1,2*10 ⁵	5,13 ± 0,16
5	S	1,25*10 ⁴	4,30 ± 0,43	1,31*10 ⁶	6,00 ± 0,38	2,92*10 ⁵	5,57 ± 0,11
6	R	7,5*10 ³	4,15 ± 0,21	7,2*10 ⁵	5,83 ± 0,17	6*10 ⁴	4,88 ± 0,16
	S	1*10 ⁴	4,24 ± 0,34	5,07*10 ⁵	5,73 ± 0,08	4,5*10 ⁴	4,75 ± 0,64
7	R	0	0	8,05*10 ⁵	5,89 ± 0,13	3,95*10 ⁵	5,61 ± 0,15
	S	2,75*10 ⁴	4,50 ± 0,71	5,45*10 ⁵	5,70 ± 0,21	1,45*10 ⁵	5,10 ± 0,25
8	R	5,75*10 ⁴	4,53 ± 0,68	8,15*10 ⁵	5,74 ± 0,45	4,72*10 ⁵	5,60 ± 0,12
	S	0	0	7,72*10 ⁵	5,76 ± 0,38	1,67*10 ⁵	5,18 ± 0,15
9	R	2*10 ⁴	4,59 ± 0,16	5,7*10 ⁵	5,71 ± 0,23	1,6*10 ⁵	5,25 ± 0,30
	S	4,25*10 ⁴	4,59 ± 0,52	7,75*10 ⁵	5,75 ± 0,41	3,75*10 ⁴	4,59 ± 0,36
10	S	7*10 ⁴	4,83 ± 0,43	4,15*10 ⁵	5,61 ± 0,11	1,82*10 ⁵	5,06 ± 0,37
C1	S	4,8*10 ⁵	5,78 ± 0,55	1,13*10 ⁶	6,05 ± 0,10	7,57*10 ⁵	5,88 ± 0,08
C2	S	1,37*10 ⁵	5,08 ± 0,50	6,57*10 ⁵	5,80 ± 0,15	3,07*10 ⁵	5,39 ± 0,31

Tabla N° 06. Promedio de los logaritmo de las ufc/g de suelo de microorganismos productores de amilasas, productores de celulasas y productores de proteasas.

		P. Amilasa		P. Celulasa		P. Proteasa	
		ufc/g s	log(ufc/g s)	ufc/g s	log(ufc/g s)	ufc/g s	log(ufc/g s)
1	R	2,5*10 ³	4 ± 0	2,95*10 ⁵	5,44 ± 0,18	7,75*10 ⁴	4,77 ± 0,68
	S	3*10 ⁴	4,33 ± 0,58	3,07*10 ⁵	5,48 ± 0,09	1,25*10 ⁵	5,07 ± 0,15
2	R	5*10 ³	4 ± 0	2,77*10 ⁵	5,38 ± 0,29	8*10 ⁴	4,93 ± 0,35
	S	2,5*10 ³	4 ± 0	8*10 ⁴	4,95 ± 0,31	5*10 ⁴	4,79 ± 0,20
3	R	5*10 ³	4,30 ± 0	4,6*10 ⁵	5,65 ± 0,13	1,2*10 ⁵	5,20 ± 0,09
	S	1*10 ⁴	4,24 ± 0,34	3,47*10 ⁵	5,54 ± 0,06	1,02*10 ⁵	5,11 ± 0,18

4	R	$1 \cdot 10^4$	$4,60 \pm 0$	$4,4 \cdot 10^5$	$5,54 \pm 0,40$	$1,17 \cdot 10^5$	$5,04 \pm 0,18$
	S	$1,75 \cdot 10^4$	$4,5 \pm 0,28$	$3,85 \cdot 10^5$	$5,57 \pm 0,11$	$4,75 \cdot 10^4$	$4,71 \pm 0,37$
5	S	$2,75 \cdot 10^4$	$5,04 \pm 0$	$3,85 \cdot 10^5$	$5,57 \pm 0,11$	$1,05 \cdot 10^5$	$5,13 \pm 0,15$
6	R	$2,5 \cdot 10^4$	5 ± 0	$1,75 \cdot 10^4$	$4,54 \pm 0,09$	$7,5 \cdot 10^3$	$4,15 \pm 0,21$
	S	0	0 ± 0	$4,75 \cdot 10^4$	$4,77 \pm 0,21$	$3,25 \cdot 10^4$	$4,43 \pm 0,51$
7	R	$8,75 \cdot 10^4$	$4,69 \pm 0,74$	$2,57 \cdot 10^5$	$5,40 \pm 0,14$	$3 \cdot 10^4$	$4,65 \pm 0,49$
	S	0	0 ± 0	$1,2 \cdot 10^5$	$5,18 \pm 0,17$	$7,75 \cdot 10^4$	$4,74 \pm 1,04$
8	R	$7,5 \cdot 10^3$	$4,15 \pm 0,21$	$2,32 \cdot 10^5$	$5,35 \pm 0,14$	$4,25 \cdot 10^4$	$4,69 \pm 0,27$
	S	$5 \cdot 10^3$	$4,30 \pm 0$	$1,8 \cdot 10^5$	$5,31 \pm 0,30$	$1,75 \cdot 10^4$	$4,54 \pm 0,09$
9	R	0	0 ± 0	$3,85 \cdot 10^5$	$5,58 \pm 0,07$	$5 \cdot 10^3$	4 ± 0
	S	0	0 ± 0	$1,75 \cdot 10^5$	$4,5 \pm 0,28$	$5,75 \cdot 10^4$	$4,87 \pm 0,11$
10	S	$1 \cdot 10^4$	$4,24 \pm 0,34$	$2,47 \cdot 10^5$	$5,34 \pm 0,26$	$4,5 \cdot 10^4$	$4,61 \pm 0,54$
C1	S	$9,25 \cdot 10^4$	$5,06 \pm 0,19$	$6,3 \cdot 10^5$	$5,80 \pm 0,04$	$1,47 \cdot 10^5$	$5,11 \pm 0,25$
C2	S	$6,25 \cdot 10^4$	$4,65 \pm 0,47$	$2,57 \cdot 10^5$	$5,36 \pm 0,26$	$1,45 \cdot 10^5$	$5,15 \pm 0,12$

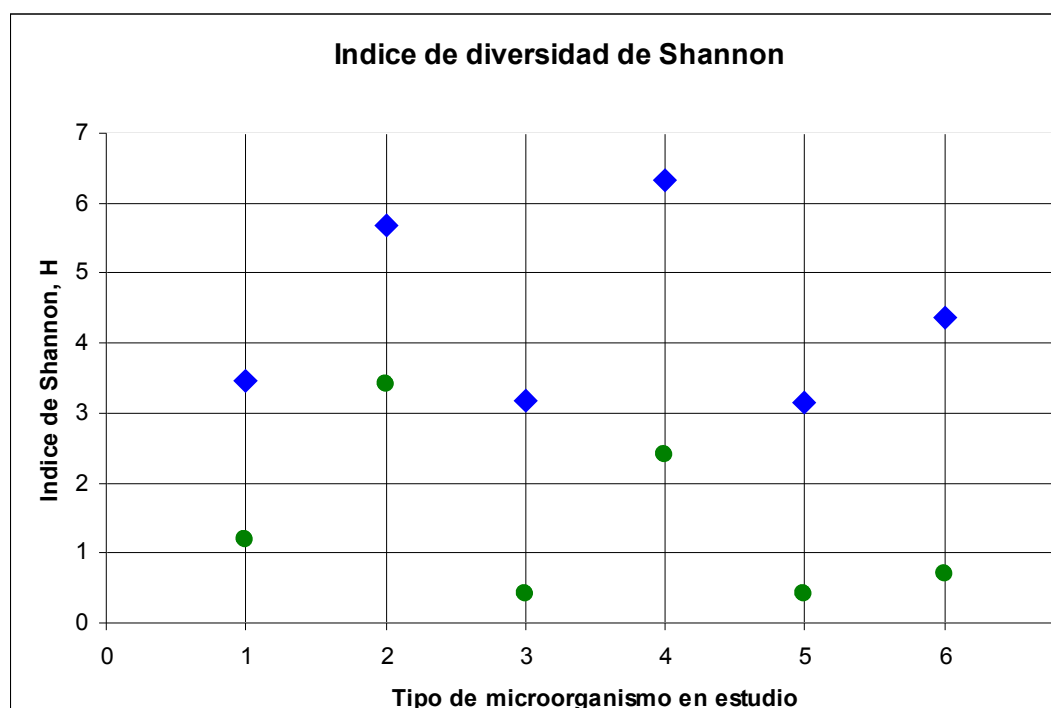


Figura N° 03. Índice de diversidad de Shannon obtenido para cada tipo de organismo en estudio. Los círculos (color verde) corresponden a las muestras impactadas y los rombos (color azul) corresponden a las muestras control. Los números 1 hongos, 2 bacterias, 3 fijadores de nitrógeno, 4 productores de amilasas, 5 productores de celulasas y 6 productores de proteasas.

El coeficiente lineal de Pearson (Tabla N° 07) mostró que la carga fúngica y bacteriana se correlacionó directa y significativamente con un 95% de confianza con los microorganismos fijadores de nitrógeno, con valores de 0,73 y 0,44 respectivamente, así como también lo hicieron los microorganismos productores de amilasa (0,65), celulasa (0,72) y proteasa (0,54). También se correlacionó las poblaciones de los microorganismos con el porcentaje de materia orgánica presente en las muestras de suelo estudiadas, obteniendo las siguientes relaciones directas entre porcentaje de materia orgánica y: Hongos (0,78); fijadores de nitrógeno (0,55); productores de amilasa (0,44) y productores de celulasa (0,49).

Tabla N° 07. Coeficiente lineal de Pearson para las variables seleccionadas.

r	Hongos	Bacterias	F.N	Amilasa	Celulasa	Proteasa	pH	% H.R	%MO
Hongos	1	0,15	<u>0,73</u>	<u>0,62</u>	<u>0,52</u>	<u>0,53</u>	-0,01	0,36	<u>0,78</u>
Bacterias	0,15	1	<u>0,44</u>	<u>0,36</u>	<u>0,42</u>	<u>0,42</u>	-0,07	0,19	0,31
F.N	<u>0,73</u>	<u>0,44</u>	1	<u>0,65</u>	<u>0,72</u>	<u>0,54</u>	-0,07	0,22	<u>0,55</u>
Amilasa	<u>0,62</u>	<u>0,36</u>	<u>0,65</u>	1	<u>0,40</u>	0,36	0,09	0,13	<u>0,44</u>
Celulasa	<u>0,52</u>	<u>0,42</u>	<u>0,72</u>	<u>0,40</u>	1	<u>0,59</u>	-0,17	0,24	<u>0,49</u>
Proteasa	<u>0,53</u>	<u>0,42</u>	<u>0,54</u>	0,36	<u>0,59</u>	1	-0,40	0,05	0,31
pH	-0,01	-0,07	-0,07	0,09	-0,17	<u>-0,40</u>	1	<u>0,44</u>	0,25
% H.R	-0,27	-0,07	-0,13	0,06	-0,34	<u>-0,34</u>	<u>0,53</u>	1	<u>0,47</u>
%MO	<u>0,78</u>	0,31	<u>0,55</u>	<u>0,44</u>	<u>0,49</u>	0,31	0,25	<u>0,47</u>	1

Nota: Los valores subrayados presentaron correlación

4.3. Diversidad de las colonias bacterianas, fúngicas, fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, productores de celulasa y productores de proteasa

De acuerdo al procedimiento del apartado 3.6, se eligieron y aislaron 10 colonias bacterianas, 8 colonias fúngicas, 2 fijadoras de nitrógeno, 6 colonias productoras de amilasa, 1 colonia productora de celulasa y 1 colonia productora de proteasa. En la tabla N° 08 se observa la cantidad de colonias para cada muestra y en la tabla N° 09 se encuentra la micromorfología de las bacterias que se encontraron y el porcentaje, con respecto a la cantidad total de colonias aisladas. La figura N° 04 muestra

vistas microscópicas de algunos microorganismos aislados. En los apéndices G y H se encuentra la descripción de cada colonia y el apéndice B muestra imágenes de algunas bacterias aisladas.

Tabla N° 08. Número de colonias aisladas por muestra.

Muestra		Bacterias	Hongos	Fijadores de N	Productores de Amilasa	Productores de Celulasa	Productores de Proteasa
1	R	1	1	0	1	0	0
	S	0	2	1	0	0	0
2	R	2	0	0	2	0	0
	S	1	0	0	0	0	0
3	R	1	1	0	0	0	0
	S	2	1	0	1	0	0
4	R	0	0	0	0	0	0
	S	0	1	1	0	0	0
5	S	1	0	0	0	0	0
6	R	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
7	R	1	0	0	1	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
8	R	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
9	R	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
10	S	0	0	0	0	0	0
C1	S	0	2	0	0	1	1
C2	S	1	0	0	1	0	0
Total		10	8	2	6	1	1

Tabla N° 09. Morfología microscópica de las colonias de bacterias aisladas.

Especie	Cantidad en muestras contaminadas	Porcentaje (%)	Cantidad en muestras control	Porcentaje (%)
Bacilos Gram positivos	2	33,33	3	50
Bacilos Gram negativos	4	66,66	3	50

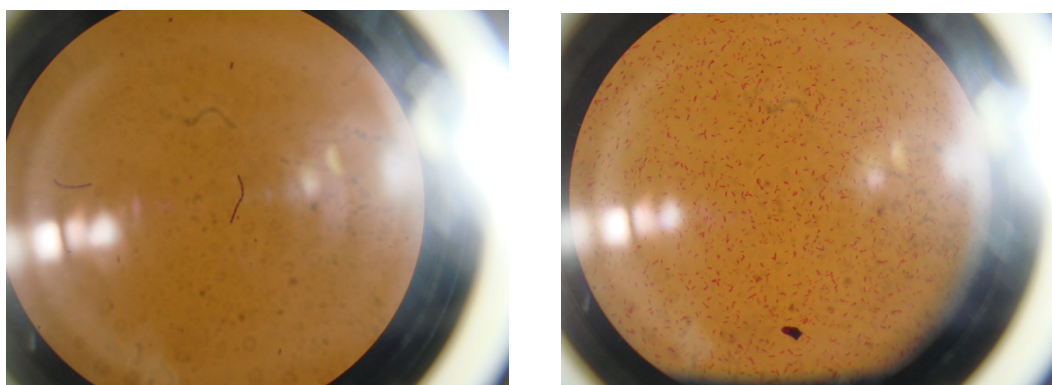


Figura N° 04. Micrografía de los microorganismos aislados. De izquierda a derecha: Bacilos Gram-positivos colonia C2-1; Bacilos Gram-negativos colonia S3-1.

Con respecto a la micromorfología de las colonias fúngicas, una vez realizado el aislamiento de las colonias se observaron al microscopio en busca de conidióforos (Apéndice C), pudiéndose identificar dos géneros de acuerdo a la estructura de estos. Los géneros identificados

corresponden a *Aspergillus* proveniente de la colonia R1-1 y *Trichoderma*, proveniente de la colonia C1-2. En la figura N° 05 se muestra una fotografía de las placas donde creció una de estas colonias identificadas y en la figura N° 06 se muestra la vista microscópica de las colonias identificadas. El resto de los hongos aislados no se pudo identificar debido a que sería necesario realizar un proceso más exhaustivo, requiriendo en algunos casos medios selectivos con los cuales no se contaba.

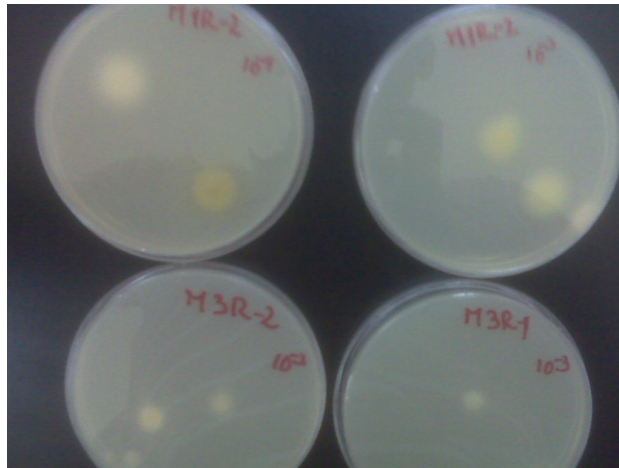


Figura N° 05. Placas de crecimiento de hongos. En la placa identificada como M1R-2-10-4 se observa en crecimiento del hongo identificado como género *Aspergillus*.

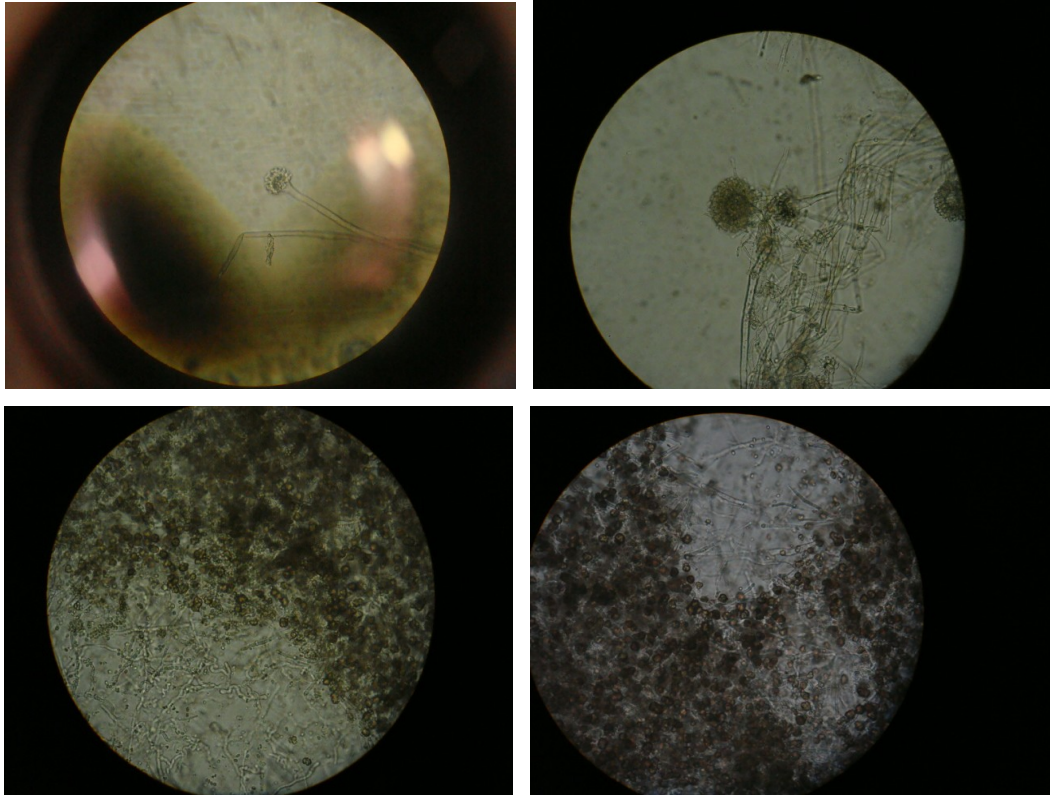


Figura N° 06. Vista microscópica de las colonias de hongos identificadas. De arriba abajo: "*Aspergillus*" proveniente de la colonia R1-1; "*Trichoderma*" proveniente de la colonia C1-2.

CAPITULO V: Discusión de resultados

Se evaluó la diversidad microbiana midiendo la cuantificación de las ufc de hongos, bacterias, microorganismos fijadores de nitrógeno, productores de amilasa, productores de celulasa y productores de proteasa tomando en consideración la ausencia y presencia de desechos urbanos como contaminantes, encontrando que este agente perturbador del suelo provoca distintos efectos dependientes de las variables fisicoquímicas estudiadas y de la naturaleza de los microorganismos presentes.

Las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo se ven profundamente alteradas cuando sobre éste se depositan residuos no biodegradables. Consecuencia directa de una contaminación edáfica moderada es la desaparición de la flora y la fauna de la región afectada, la alteración de los ciclos biogeoquímicos y la pérdida de nutrientes esenciales para la existencia de vida animal o vegetal (Garrido de las Heras, 1998). Esto se evidenció en nuestro caso al observar los diferentes valores de diversidad obtenidos en las muestras control con respecto a las impactadas.

A través del tratamiento estadístico efectuado (índice de Shannon) se determinó que la diversidad microbiana disminuye con la presencia de los desechos urbanos para todos los estudios, sobretodo en los microorganismos productores de amilasa y en menor proporción en las ufc de hongos y bacterias en general, lo cual confirma que los desechos urbanos son perjudiciales para la microbiota del suelo, generando como consecuencia una variación de los parámetros bioquímicos, traduciéndose esto en una disminución de la salud del suelo; esto se aprecia con mayor facilidad al observar la figura N° 03, donde se aprecia que el índice de Shannon es mayor para las muestras control comparado con las muestras impactadas.

Otro resultado relevante es que tanto la carga de microorganismos fijadores de nitrógeno como la de productores de amilasa, celulasa y proteasa se correlacionó directamente con la carga fúngica y bacteriana presente en las muestras en estudio, lo cual quiere decir que todos se ven afectados de la misma manera, por lo tanto, al disminuir la carga general de hongos y bacterias en el suelo también disminuirá la producción de amilasa, celulasa y proteasa; y de la misma manera se verá afectada la fijación del nitrógeno atmosférico en el suelo, lo cual también resulta perjudicial para la salud de éste.

Por otra parte, dado a que la carga microbiana cultivable se vio disminuida en las muestras impactadas con desechos urbanos con respecto a las muestras no impactadas, se puede decir que la contaminación con desechos urbanos guarda una relación inversamente proporcional con la carga microbiana del suelo en estudio. Duarte, en el 2007 demostró un hecho similar pero por métodos moleculares y trabajando con aceites sulfurados como contaminantes; Oropeza (2010) demostró otro hecho similar al observar que la carga microbiana cultivable disminuyó en las muestras impactadas con petróleo con respecto a las no impactadas lo que afianza la idea de que no en todas las ocasiones todos los microorganismos pueden adaptarse, tal vez, sólo una pequeña parte lo haga y esto no sea lo suficientemente eficiente como para mantener la salud del suelo. Es importante acotar que la cantidad de organismos cultivables a través de métodos de siembra y conteo no es lo suficientemente representativa y que el uso de técnicas moleculares puede ayudar a mejorar estas hipótesis (Prescott y col., 2004).

A través de la macro y micromorfología se pueden observar las diferencias y similitudes entre los organismos encontrados en las muestras estudiadas, en los controles se encontró una diversidad del 50% de bacterias del tipo bacilos Gram-positivas y 50% de bacilos Gram-negativas, en las muestras impactadas se encontró una disminución de la

diversidad, obteniéndose un porcentaje de bacterias del tipo bacilos Gram-positivas de 33,33% y del tipo bacilos Gram-negativo un 66,66% lo cual nuevamente se traduce en una disminución en la salud del suelo por lo descrito por Prescott y col. (2004), donde se señala que las bacterias Gram positivas son parte importante del suelo y que desempeñan un papel fundamental en la degradación de hidrocarburos, materiales vegetales y humus.

Solo un tipo de bacterias existente en las muestras control no fue capaz de desarrollarse en ninguna de las muestras impactadas, esta fue identificada como bacilos Gram-positiva, presentó una macromorfología filamentosas blanca semicircular y resultó ser productora de amilasa, este hecho se debe claramente a que aparte de la gran cantidad de desechos urbanos presentes en las muestras impactadas el terreno carecía de flora y vida vegetal, por consiguiente, la cantidad de almidón disponible como sustrato para las bacterias es menor que en las muestras no impactadas, produciéndose así la muerte o la inexistencia de las bacterias degradadoras del tipo de almidón ausente en las muestras de suelo impactadas con desechos urbanos; Carrillo en el 2003 presentó un trabajo donde expuso que las amilasas son inducibles, pero su producción depende del tipo de almidón empleado. Las α -amilasas de *Bacillus stearothermophilus* y *B. licheniformis* son termoestables así como las excretadas por algunos clostridios termófilos, los que también excretan pululanasa. La actividad amilolítica varía a veces con el tipo de vegetación, la humedad y las características del suelo. La disminución de las UFC de productores de celulasa y de productores de proteasa se debe en cierta parte a este mismo fenómeno pero un resultado revelador y contundente para la explicación de este hecho es la dependencia directa que existe entre los microorganismos fijadores de nitrógeno con los productores de celulasa y de proteasa (Ver tabla N° 07) dado que la carga de microorganismos fijadores de nitrógeno se vio afectada de manera negativa por la presencia del contaminante, esto va de acuerdo con lo

explicado por Carrillo en el 2003 cuando dice que los principales factores ambientales que afectan la descomposición de la celulosa en el suelo son el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, la aireación, la humedad, el pH, la presencia de otros glúcidos y la producción de lignina en los restos vegetales y que la degradación de proteínas en el suelo va seguida de la formación de amonio por la posterior descomposición de los aminoácidos. Las sustancias con las que está asociada la celulosa en los desechos vegetales influyen sobre la velocidad de la descomposición. La degradación de 30g de celulosa, de los cuales 20 a 30% sirven para la síntesis microbiana exige la provisión de 1g de nitrógeno. Cuando la presencia de lignina hace más lenta la celulólisis se requiere menos cantidad de nitrógeno, porque este es poco a poco reciclado. Para los hongos que hidrolizan lignina y celulosa la relación C/N es mayor que 300.

Un hecho curioso e interesante ocurrido durante el estudio fue la persistente presencia de una bacteria muy particular única y exclusivamente en la muestra denominada como S5, dicha colonia bacteriana presentó características macromorfológicas particulares (ver figura N° B-1) como son su color (rojo intenso) y su brillo, esta bacteria se identificó micromorfológicamente como bacilos Gram-negativo; se presume que dicha bacteria se desarrolla favorablemente en el área de la toma de la muestra S5 dado a que dicha muestra presenta el mayor porcentaje de humedad relativa, de hecho, fue la muestra que se tomó mas cercana a la laguna que se encuentra a las adyacencias del antiguo vertedero, esta, presenta valores de pH, porcentaje de materia orgánica, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico similares al resto de las muestras analizadas.

Al evaluar la correlación entre la carga de los diferentes microorganismos estudiados con las características fisicoquímicas del suelo se observó que el pH no tuvo relación directa sobre la población de

los diferentes organismos, esto quiere decir que existe otro parámetro con mayor peso o de mayor importancia que está influyendo sobre el desarrollo de los hongos y las bacterias, dichos parámetros pueden ser el porcentaje de materia orgánica y humedad relativa, esto puede deberse al bajo valor que dichos parámetros presentan en las muestras en estudio y aunado a esto, que el pH se mantiene prácticamente constante y en valores óptimos para el desarrollo de los microorganismos. Es importante destacar que el terreno en el cual se recolectaron las muestras es bastante árido, por lo que la humedad presente en los suelos es muy escasa, lo que reduce sustancialmente la materia orgánica, dificulta el crecimiento y disminuye la posibilidad de sobrevivencia de los hongos (Atlas y Bartha 2002), esto se puede tomar como una de las posibles razones de la baja diversidad de colonias fúngicas.

En general, la carga microbiana de todas las comunidades bacterianas y fúngicas fue siempre mayor en las muestras control (o no impactadas) y la micromorfología demostró que las bacterias Gram-negativas fueron mas resistentes que las Gram-positivas a la presencia del contaminante; también se observó que la carga bacteriana no se correlacionó con ningún parámetro fisicoquímico estudiado, lo que quiere decir que en el suelo en estudio su desarrollo depende de algún otro factor ya sea temperatura, tiempo, entre otros, y que los parámetros fisicoquímicos estudiados permanecen en valores desfavorables o no aptos para el desarrollo de los microorganismos en el suelo (poca humedad, bajo contenido de materia orgánica, entre otros).

CAPITULO IV. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Se aislaron y caracterizaron 10 colonias bacterianas, 8 colonias fúngicas de las cuales se caracterizaron solo dos, 2 colonias de microorganismos fijadores de nitrógeno, 6 colonias productoras de amilasa, una colonia de productores de celulasa y una colonia de microorganismos productores de proteasa.
- Se cuantificó la carga bacteriana ($4,15 \cdot 10^5$ - $1,13 \cdot 10^6$), fúngica (0 - $4,8 \cdot 10^5$), de microorganismos fijadores de nitrógeno ($3,75 \cdot 10^4$ - $7,57 \cdot 10^5$), de productores de amilasa (0 - $9,25 \cdot 10^4$), de productores de celulasa ($1,75 \cdot 10^4$ - $6,3 \cdot 10^5$) y de microorganismos productores de proteasa ($5 \cdot 10^3$ - $1,47 \cdot 10^5$).
- Existe una relación directa entre las cargas fúngica, de microorganismos fijadores de nitrógeno, de productores de amilasa y de productores de celulasa con el porcentaje de materia orgánica presente en las muestras de suelo estudiadas.
- La muestra Control 1 presentó el mayor porcentaje de materia orgánica.
- El índice de Shannon demostró que la diversidad microbiológica disminuyó con la presencia del contaminante.
- Tras la observación microscópica se identificaron dos géneros de hongos, *Aspergillus* y *Trichoderma*.
- Las bacterias Gram-negativas resultaron ser más resistentes a la presencia del contaminante.

- En las muestras de suelo estudiadas se obtuvo un 57,14% de bacterias del tipo Gram-negativas y un 42,86% del tipo Gram-positivas.
- Todas las bacterias estudiadas fueron del tipo Bacilos.

6.2 Recomendaciones

- Complementar este trabajo con un estudio más detallado sobre la composición de los desechos urbanos que se encuentran en el antiguo vertedero en cuestión.
- Realizar el análisis de la diversidad a través de métodos moleculares para tener una mejor perspectiva de los organismos presentes y de esta manera, también, identificar por completo a las especies aisladas.
- Realizar estudios para cuantificar la presencia de microorganismos productores de gases inflamables.
- Se le recomienda a la alcaldía del municipio realizar estudios de caracterización de bacterias y hongos en el antiguo vertedero, para verificar la existencia de agentes patógenos y poder definir o establecer una especie de índice de patogenicidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Acuña, O., Peña, W., Serrano, E., Pocasangre, L., Rosales, F., Delgado, E., Trejos, J. y Segura, A.** (2006, octubre). La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de los suelos. Trabajo expuesto en ACORBAT. Joinville-Santa Catrina. Brasil.
- **Alexander, M.** (1980). Microbiología del suelo. AGT editores. México.
- **Andrade, M.J., Correa, C., Cueva, P., Simba, S.** (2009). Producción de un biofertilizante a partir de cepas *Azotobacter* spp. Aisladas de plantaciones de Stevia Rebaudiana.
- **Argandoña, M., Fernandez-Carazo, R., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Caba, J.M., Quesada, E., Del Moral, A.** (2005). The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free living diazotroph. *FEMS Microbiology* **244**: 69-74.
- **Atlas, R. M. y Bartha, R.** (2002). Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4ª Edición. Pearson Educación. Madrid. Págs. 366-368, 522.
- **Bautista, Z. F., Delfín G. H., Palacio J. L. y Delgado C.** (2004). Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. 1era Edición. D. R. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. Págs. 188.
- **Bear, F. E.** (1964). Chemistry of the soil. Rheinhold, Nueva York.

- **Brookes, P. C.** (1985). Microbial biomass and activity measurements in soil. *Journal of science food agricultural* 36: 269-271.

- **Carrillo, L.** (2003). *Microbiología agrícola*. Capítulo 3.

- **Commission of the European Communities, COM** (2002). Towards a thematic strategy for soil protection. Commission of the European communities. Bruselas.

- **Contreras A., P. A.** (2005). Suelos contaminados con hidrocarburos: RNA 16S como indicador de impacto. Trabajo de pregrado no publicado. Universidad de Chile. Chile.

- **Doran, J. W.; Coleman, D. C.; Bezdicek, D. F.; Stewart, B. A.** (1994). Defining soil quality for a sustainable environment. *SSA Sp. Pub.* 35, Madison. 244 p.

- **Duarte, G.; Soares, A.; Seldin, L.; Araujo, W. And Van Elsas, J.** (2001). Analysis of bacterial community structure and sulfur-oxidizing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67 (3)**: 1052-1062.

- **Duchafour, Ph.** (1984). *Edafología: I: Edafogénesis y clasificación*. Versión española por T. Carballas (CSIC). T-Masson ed., Barcelona.

- **Fers, C.** (2010). Perdemos el suelo y no le damos importancia. Pág.: 1. Extraído el 23 de febrero de 2011 de: http://www.produccion-animal.com.ar/suelos_ganaderos/79-Perdemos_suelo.pdf

- **Frostergard, A.; Baath, E. and Tunlid, A.** (1993). Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipids fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 723-730.

- **García, C.; Hernández, M. T.** (2000). Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España. (CSIC). Murcia. Pág. 1.

- **Garrido de las Heras, Santiago.** (1998). Regulación Básica de la Producción y Gestión de Residuos. Fundación Confemetal

- **Instituto Geográfico Venezolano Simón Bolívar (I.G.V.S.B.)** (2003). Taxonomía de los suelos Documento en línea, disponible en http://www.mipunto.com/venezuelavirtual/mapas/mapa_taxonomía_suelos.html consultado el 15 de mayo de 2010.

- **Jackson, M. L.** (1970). Análisis químico de suelos. 2ª Ed. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. P. p. 662.

- **Jaramillo, D.** (2002). Introducción a la ciencia del suelo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias P. p 202-205.

- **Jenkinson, D. S.; Ladd, J. N.** (1981). Microbial biomass in soils: measurement and turnover. En: E. A. Paul & J. N. Ladd (eds.), *Soil Biochemistry Vol. 5.* Marcel Dekker, New York. pp. 415-417.

- **Lenoir, C., Tornari, G.** (2004). Contaminación y tratamiento de suelo. Pág. 18.

- **Lewandowski, A.; Arlene.; Tugel.** (2000). Soil Biology Primer. Deb Happe-vonArb, eds. Rev. ed. Ankeny, Iowa: Soil and Water Conservation Society.

- **Matsushita, M.; Ito, S.; Meguro, S. and Kawachi, S.** (2007). Structure of soil microbial communities in sugi plantations and seminatural broad-leaved forests with different land-use history. *Can. J. For. Res.* 37: 236-246.

- **Mc Bride, M.B.** (1995). Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: are USEPA regulations protective? *J. Environ. Qual.* 24, 5-18.

- **Metting, F. B., Jr.** (1993). Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental management. Marcel ceker, Nueva York.

- **Millán, I.; Mini, G.; Ontiveros, L.; Vallejos, M.; Virhuez, M.** (2005). La actividad industrial en relación con la contaminación actual del suelo en San Juan. Pág. 2.

- **Nannipieri, P.** (1984). Microbial biomass and activity measurements in soil: ecological significance. *Curr. Persp. Microb. Ecol.*, Washington, DC. 515-521 pp.

- **Nelson K. E., Weinel C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A. P., Fouts D. E., Gill S. R, Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., T. DeBoy R., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R, Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D.,**

Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J., Timmis K. N., Düsterhöft A., Tümmler B., M. Fraser C. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida*. KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799-808.

• **Nogales, B.** (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* **14 (2)**: 41-51.

• **Olarte, R. L.** (1979). Métodos analíticos de laboratorio de suelos. 4ª. Ed. IGAC. Bogotá. 644 p.

• **Oropeza, J.** (2010). Diversidad Microbiológica de Bacterias y Hongos en Suelos Impactados con Petróleo, provenientes de Yaracal, Estado Falcón Venezuela.

• **Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein, D. A.** (2004). Microbiología. Quinta Edición. McGraw-Hill Interamericana de España, S. A. U. España. Págs. 28, 62, 112, 113, 114, 457, 458.

• **Pulido, C.;** Roiz, J. M.; Rubio, N. (2002). Biología y Geología 1. Disponible en línea en: http://personales.ya.com/geopal/g-b_1bach/soltem5.htm, consultado el 22 noviembre de 2010 a las 19:28.

• **Schollenberger, C. J. and Simon, R. H.** (1945). Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil – Ammonium acetate method. *Soil Sci.*, **59**: 13-24.

- **Srivastava, R., Roseta, D., and Sharma, A. K.** (2007). The evaluation of microbial diversity in a vegetable based cropping system under organic farming practices. *Appl. Soil Ecol.* **36**: 116-123.

- **Smil, V.** (2000). Cycles of life. Disponible en línea en: http://es.wikipedia.org/wiki/Fijaci%C3%B3n_de_nitr%C3%B3geno, consultado el 02 de noviembre de 2010 a las 22:20.

- **Van, B. P. y Doelman, P.** (1997). Significance and application of microbial toxicity test in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere.* **4**: 455-499.

- **Walinga, I., Kithome, M., Novozamsky, I., Houba, V.J.G. and Van der Lee, J.J.** (1992). Spectrophotometric determination of organic carbon in soil. Págs: 1935-1944.

- **Yu, Z., Stewart, G. and Mohn, W.** (2000). Parent contradiction: psychrotolerant bacteria from hydrocarbon-contaminated arctic tundra soils that degrade diterpenoids synthesized by trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5148-5154.

APÉNDICES

Apéndice A. Macro y Micromorfología Microbiana

Apéndice A-1. Metodología para realizar la Morfología de las colonias microbianas

El desarrollo de colonias sobre la superficie de agar permite identificar las colonias por que las especies forman a menudo colonias de una forma y aspecto característico. La figura A.1 muestra las diferentes características utilizadas para describir la morfología de colonias bacterianas reportadas por Prescott y col. (2004).

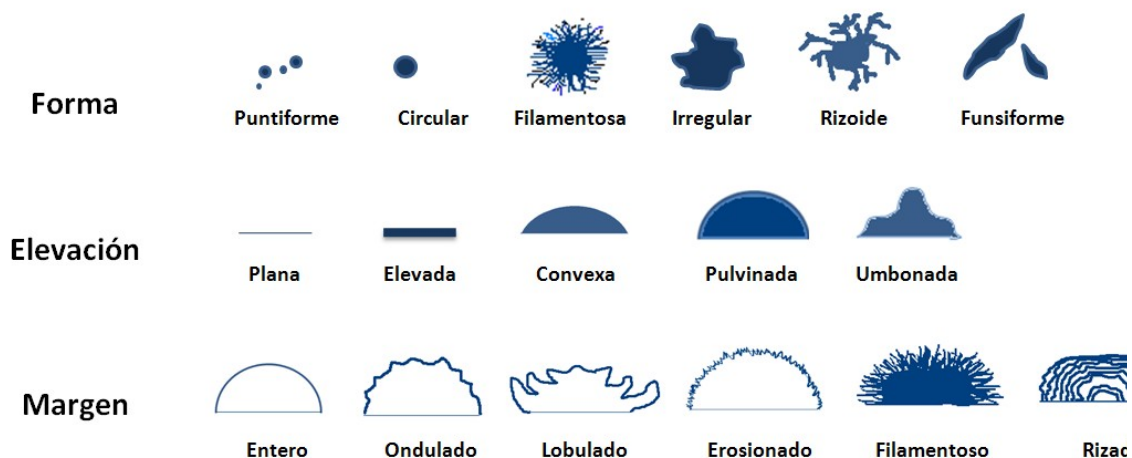


Figura A-1. Morfología de colonias bacterianas. Tomado de Prescott y col., 2004

Apéndice A-2. Descripción del método de tinción de Gram

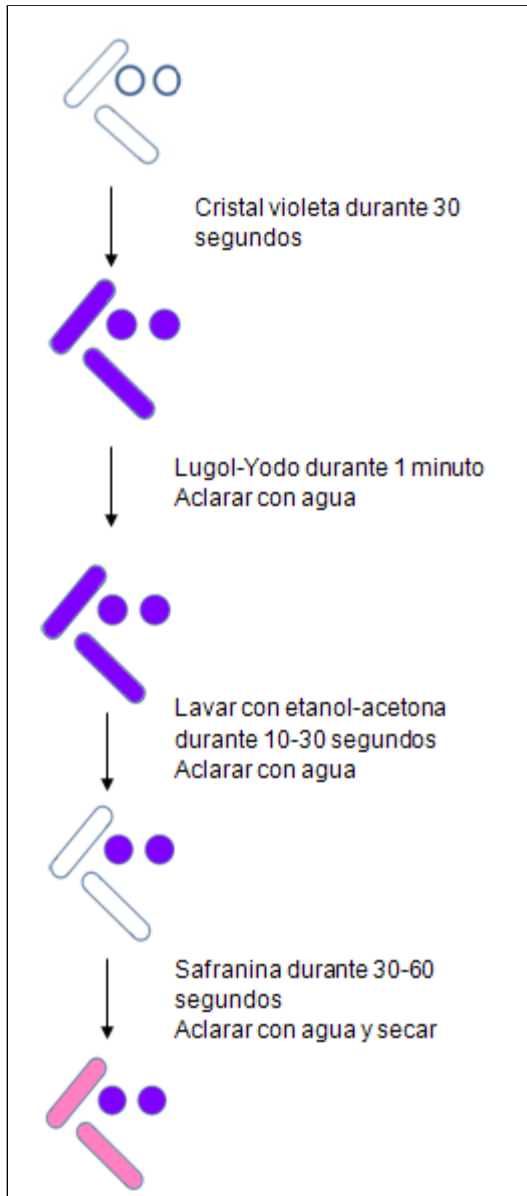


Figura N° A-2. Resumen de la tinción de Gram.

La caracterización micromorfológica de las bacterias se realizó mediante la tinción de Gram, de acuerdo al procedimiento descrito por Prescott et al 2004 (Figura N° A-2) como sigue:

1. Se incubaron todos los microorganismos a los cuales se les iba a realizar la tinción en 5mL de medio LB Broth, por 24 horas.

2. Se tomó un asada de cultivo y se colocó en un porta objeto, haciendo movimientos circulares de manera de expandirlo por la mayor cantidad de la superficie del porta objeto. Se dejó evaporar la solución y se fijaron las células flameando los portaobjetos.
3. Se agregó una solución de cristal violeta (Apéndice A.3), sobre las células y se dejó actuar por 45 segundos. Se eliminó el cristal violeta mediante lavado con agua.
4. Se añadió lugol (Apéndice A.3) y se dejó actuar por 45 segundos. Se lavó con agua. Después se agregó la solución de etanol (Apéndice A.3) hasta la desaparición del color azul. Inmediatamente se lavó con agua.
5. Se agregó una solución de safranina (Apéndice A.3) y se dejó actuar por 45 segundos y se lavó con agua.
6. Una vez lista la tinción se observaron las células por el microscopio en aceite de inmersión.

Apéndice A-3. Soluciones empleadas para la tinción de Gram

Solución de Cristal violeta: 2 gramos de cristal violeta en 30mL de alcohol etílico.

Solución de Lugol: 1 gramo de Yodo, 2 gramos de yoduro de potasio en 200mL de agua destilada.

Solución alcohol: Alcohol Etílico 97%

Solución de Safranina: 0.10 gramos de fucsina básica en 100mL de agua destilada

Apéndice B. Fotos tomadas de algunas colonias de bacterias aisladas



Figura B-1. Colonia S5-1



Figura B-2. Colonia C2-1



Figura B-3. Colonia R1-1



Figura B-4. Colonia S3-1



Figura B-5. Colonia S3-2



Figura B-6. Colonia R3-1

Apéndice B-1. Fotos tomadas de algunas pruebas positivas para detectar microorganismos productores de amilasa

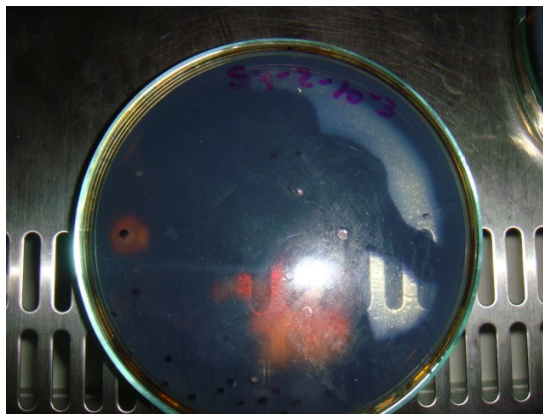
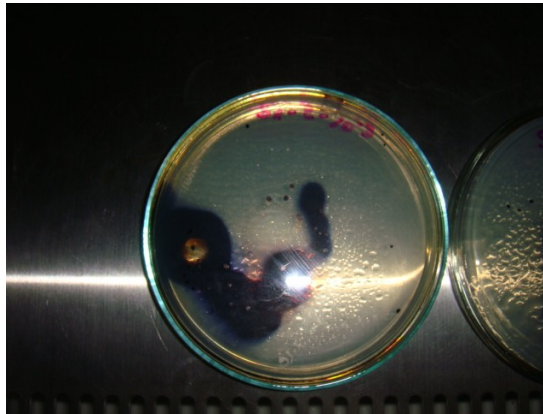
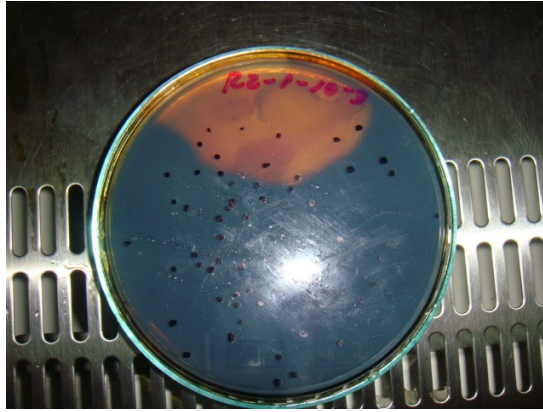


Figura B-7. Pruebas positivas de microorganismos productores de amilasa.

Apéndice C. Conidióforos

En ciertos hongos, el **conidióforo** es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidias. Se localizan al extremo de hifas las cuales levantan el conidióforo en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia (Prescott y col., 2004).

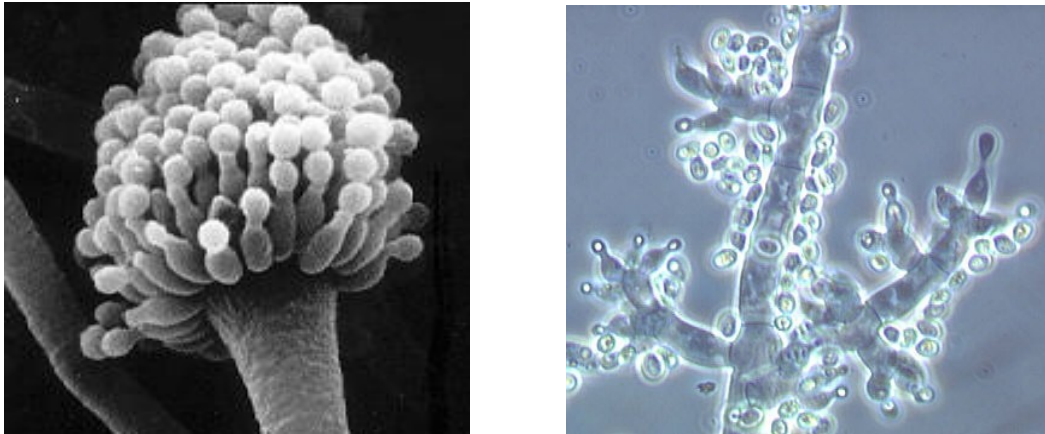


Figura C-1. Conidióforos de los hongos *Aspergillus* y *Trichoderma*. (Nombrados de izquierda a derecha)

Apéndice D. Índice de Shannon

El índice de Shannon (Srivastava y col. 2007) es un parámetro de diversidad utilizado para relacionar la existencia individual de individuos de acuerdo a una población existente. Este índice se calcula de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Primero se calcula el número total de muestras de acuerdo a cada especie en estudio y se suman, obteniendo un N_{total} .

$$N_{total} = N_{bacterias} + N_{hongos}$$

Luego se calcula P_i que es la abundancia relativa o proporción de cada especie en la población, de acuerdo a:

$$P_i = \frac{n_i}{N_{total}} \quad \text{donde } n_i \text{ es el valor de cada muestra.}$$

Por último se determina el \log_{10} de P_i y este valor se le multiplica a P_i y se suman todos los valores (donde esto es igual a Q), en este caso para las bacterias y para los hongos.

El índice de Shannon, H, se calcula con el inverso negativo de Q.

$$Q = \sum P_i * \log P_i \quad H = -\frac{1}{Q}$$

Con H se realizará el gráfico de diversidad de acuerdo a cada muestra.

Apéndice E. Coeficiente de correlación de Pearson

El coeficiente de Pearson se obtiene a través de las ecuaciones de Microsoft Excel. Una vez hecho esto, se determina la desviación estándar a través de la ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{1-r^2}{n}}$$

Donde r es el coeficiente de Pearson y n el número de muestras.

Después se determina el error del r a un determinado intervalo de confianza. Comparando los valores de r con su error se determina si hay o no correlación. Si el error es mayor que el r no hay significancia, pero si r es mayor al error entonces si hay significancia, es decir, correlación.

Apéndice F. Preparación de medios de cultivo

Apéndice F-1. Preparación de medio de cultivo agar LB

Pesar 10g de peptona (Tristona), 5g de extracto de levadura y 10g de cloruro de sodio y disolverlos en 900ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 2 litros, llevar a pH 7,0 con NaOH (aprox. 0,24ml de NaOH 10N), aforar a 1 litro en una probeta exclusiva para este fin, autoclavar el medio de cultivo a 121°C por 20min (es aconsejable usar cinta adhesiva “de autoclave” para verificar la esterilidad del material).

Apéndice F-2. Preparación de medio mínimo suplementado con caseína

Tabla F-1. Preparación de la solución A (10X)

Sustancia	1 Litro
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	47g
K ₂ HPO ₄	115g
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,4g

Tabla F-2. Preparación de la solución B (100X)

Sustancia	1 Litro
HCl 36%	1ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,028g
MgSO ₄ ·H ₂ O	7,4g
ZnCl ₂	0,013g
CaCl ₂	0,147g

Para preparar 2 litros de medio de cultivo agar-agar con caseína se prepara mezclan 100ml de la solución A con 10ml de solución B y se afora a 1 litro con agua destilada, aparte se prepara una mezcla de 20g de agar-agar con 20g de caseína y se prepara una solución de 1 litro; estas dos soluciones se autoclavan por 15 minutos a 121°C y luego de que disminuya la temperatura a aproximadamente 70°C se mezclan ambas soluciones.

Apéndice F-3. Preparación del medio de cultivo Agar celulosa microcristalina:

Se preparan 200ml de agar – agar (4g de agar – agar en 200ml de medio mínimo) y se agregan 2g de celulosa microcristalina, se esteriliza en un autoclave a 121°C por 20min. La celulosa microcristalina es insoluble.

Apéndice G. Morfología de las colonias bacterianas

Tabla G-1. Macromorfología y micromorfología de las colonias bacterianas

Nombre	S5-1	C2-1	R1-1
Origen	S5	C2	R1
Forma	Deforme	Filamentosa semicircular	Filamentosa
Elevación	Convexa	Plana	Plana
Color	Rojo	Blanco	Blanco
Tono	Brillante	Mate	Mate
Micromorfología	Bacilos Gram- negativo	Bacilos Gram- positivo	Bacilos Gram- negativo

Continuación

S1-1	S3-1	S3-2	R3-1
S1	S3	S3	R3
Circular mal definida	Circular puntual	Filamentosa	Filamentosa ovular
Plana	Convexa	Plana	Plana
Transparente	Blanco amarillento	Transparente lechosa	Blanco amarillento
Mate	Brillante	Mate	Mate
Bacilos Gram- positivo	Bacilos Gram- negativo	Bacilos Gram- positivo	Bacilos Gram- negativo

Apéndice H. Macromorfología de las colonias fúngicas

Tabla H-1. Macromorfología y micromorfología de las colonias fúngicas

Nombre	C1-1	C1-2	S4-1	S3-1
Origen	C1	C1	S4	S3
Forma	Circular	Irregular	Circular	Circular
Elevación	Convexa	Plana	Plana	Convexa
Color	Blanco	Verde	Transparente	Rosado
Micromorfología	Morfotipo desconocido	Trichoderma	Morfotipo desconocido	Morfotipo desconocido

Continuación

R3-1	S1-1	S1-2	R1-1
R3	S1	S1	R1
Circular	Filamentosa	Circular	Circular
Plunvinada	Plana	Plana	Convexa
Blanco	Blanco	Blanco	Ocre
Morfotipo desconocido	Morfotipo desconocido	Morfotipo desconocido	Aspergillus