



**INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

Ingeniería Bioquímica

PROYECTO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

**“Determinación de concentración no tóxica de Bifenilos
Policlorados en lombrices”**

Laboratorio de Biotecnología

FECHA DE INICIO

10/Agosto/2012

FECHA DE TÉRMINO

10/Diciembre/2012

ASESOR INTERNO

Dra. Rocío Meza Gordillo

REVISORES

Q.B.P. Aura Flores Pérez.

M. en C. José Humberto Castañón González

PRESENTA ALUMNO

C. Vázquez Tawas José Daniel

NÚMERO DE CONTROL

07270266

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas Diciembre del 2012

Contenido

Lista de figuras.....	IV
Lista de cuadros	VI
Introducción	1
Justificación	2
Objetivos	3
General.....	3
Específicos	3
Caracterización del área	4
Problemática a resolver.....	5
Alcances y limitaciones	5
Alcances.....	5
Limitaciones.....	5
Fundamento teórico	6
Bifenilos policlorados (BPC's)	6
Biorremediación y uso de lombrices.....	8
Procedimiento y descripción de actividades realizadas	12
Análisis proximal del peat moss.....	12
Determinación de humedad.....	12
Determinación de cenizas.....	12
Determinación de extracto etéreo.....	13
Determinación de proteínas.....	13
Digestión	14
Destilación	14
Titulación.....	15
Análisis microbiológico	15
Técnica de muestreo.	15
Preparación de diluciones.....	16
Preparación de las diluciones decimales adicionales.....	17
Metodología del aislamiento e identificación.....	17
Pasos para la identificación:	17

Paso 1: Pre-enriquecimiento.....	17
Paso 2: Enriquecimiento selectivo.....	18
Paso 3: Selección en medios sólidos.....	19
Agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS).....	19
Agar Verde Brillante (VB).....	19
Agar XLD.....	19
Agar Eosina Azul de Metileno (EMB).....	20
Agar MacConkey.....	20
Agar <i>Escherichia coli</i> Directo (ECD).....	20
Paso 4: Identificación bioquímica.....	20
Resultados.....	21
Composición de los componentes del sistema en base seca.....	21
Resultados teniendo como variables el número de lombrices.....	21
3 lombrices.....	22
Humedad.....	22
Cenizas y materia Orgánica.....	23
Extracto etéreo.....	24
5 lombrices.....	25
Humedad.....	25
Cenizas y materia Orgánica.....	26
Extracto etéreo.....	27
7 Lombrices.....	28
Humedad.....	28
Cenizas Y Materia Orgánica.....	29
Extracto Etéreo.....	30
Resultados Microbiológicos.....	31
Identificación microbiológica en Excreta de conejo.....	31
Identificación microbiológica en lombriz (<i>Eisenia foetida</i>).....	40
Identificación microbiológica en la relación excreta (85%)-peat moss (15%).....	45
Conclusión.....	50
Bibliografía.....	51

Lista de figuras

Figura 1: Imagen de la posición de cloros en el bifenilo.	6
Figura 2: Relación del porcentaje de excreta y el porcentaje de humedad en un sistema de 3 lombrices.	22
Figura 3: Relación de Cenizas (%) y Materia Orgánica (%) con respecto al porcentaje de excreta en un sistema con 3 lombrices.....	23
Figura 4: Relación que existe entre la cantidad de Excreta (%) y la cantidad de Grasas (%) en un sistema de 3 lombrices.....	24
Figura 5: Relación de excreta de conejo (%) y la Humedad (%) contenida en un sistema de vermicomposteo con 5 lombrices.....	25
Figura 6: Relación de la cantidad de cenizas (%) y Materia Orgánica (%) contra la cantidad de Excreta de Conejo dentro de un sistema de vermicomposteo con 5 lombrices.	26
Figura 7: Relación que existe entre la concentración de excreta (%) y la de Grasas (%) en un sistema de vermicomposteo con 5 lombrices.	27
Figura 8: Relación de la cantidad de Excreta (%) y la cantidad de Humedad (%) en un sistema de vermicomposteo de 7 lombrices.....	28
Figura 9: Relación de la cantidad de cenizas (%) y Materia Orgánica (%) contra la cantidad de Excreta de Conejo dentro de un sistema de vermicomposteo con 7 lombrices.	29
Figura 10: Relación que existe entre la concentración de excreta (%) y la de Grasas (%) en un sistema de vermicomposteo con 7 lombrices.....	30
Figura 11: Fotografía que muestra los 3 tipos de medios de cultivo utilizado en la identificación de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	31
Figura 12: Fotografía de crecimiento Bacteriano, en agar MacConkey en busca de la identificación de <i>Escherichia coli</i>	32
Figura 13: Fotografía tomada al medio ECD con un crecimiento bacteriano, en la identificación de <i>Escherichia coli</i> en excreta de conejo.	33
Figura 14: Fotografía tomada en la cámara de luz UV, en la cual se manifiesta la presencia de fluorescencia a una longitud de 366 nm.	33
Figura 15: Fotografía que nos muestra los 3 tipos de agares implementados para la identificación de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> en la excreta de conejo.	35
Figura 16: Fotografía que muestra crecimiento bacteriano, inoculado con muestra de excreta de conejo.	36
Figura 17: Fotografía tomada de agar XLD el cual fue inoculado con muestra de excreta de conejo.	37
Figura 18: Fotografía tomada de 3 placas de agar King B.	38

Figura 19: Fotografía tomada de la incubación de excreta de conejo por 24 h. en medio King B, para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*. 38

Figura 20: En la fotografía se presentan los diferentes agares utilizados en la identificación de *Escherichia coli* en *Eisenia foetida*..... 40

Figura 21: Presencia de fluorescencia en medio ECD el cual actúa a una longitud de onda de 366 nm..... 41

Figura 22: En la fotografía se aprecia el Test *Salmonella-Shigella* el cual consta de 3 agares selectivos-diferenciales. 42

Figura 23: Fotografía del medio XLD con inóculo de lombriz. 43

Figura 24: Fotografía de un cultivo típico de *Escherichia coli* en medio MacConkey. 46

Figura 25: Fotografía tomada del inóculo de la relación de sustratos a 24 horas de incubación..... 47

Figura 26: Fotografía tomada de cultivo de *Pseudomonas* presente en la Relación de los sustratos. 49

Lista de Tablas.

Tabla 1: Resultados de los análisis de peat moss, vermicomposta y excreta de conejo... 21

Introducción

Uno de los problemas que afecta a México y al mundo entero son los residuos y el manejo de estos, entre los más importantes, son los tóxicos, los cuales se consideran como sustancias ajenas al cuerpo y que interviene en alguna función de este, causando efectos mínimos hasta la muerte. Entre estos tipos de residuos destacan los bifenilos policlorados (BPC's) que se han convertido en un grave problema ambiental.

Los BPC's constituyen una serie de 209 congéneres, los cuales se forman mediante la cloración de diferentes posiciones del bifenilo, diez en total y se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente de todo el mundo, son persistentes y se acumulan en la cadena alimentaria y por esto se requiere una alternativa de eliminación, la cual sea amigable con el medio ambiente.

En busca de una alternativa de para la biorremediación de los suelos contaminados con BPC's se recurrió a la técnica de vermicomposteo con *Eisenia foetida*, la cual ha demostrado en diferentes estudios un alto poder de conversión de materia orgánica. En tanto que la vermicomposta es el producto de una serie de transformaciones bioquímicas y microbiológicas que sufre la materia orgánica al pasar a través del tracto digestivo de las lombrices (Edwards *et al.* 1984).

Además, la vermicomposta contiene sustancias activas que actúan como reguladores de crecimiento, elevan la capacidad de intercambio catiónico (CIC), tiene alto contenido de ácidos húmicos, y aumenta la capacidad de retención de humedad y la porosidad, lo que facilita la aireación, drenaje del suelo y los medios de crecimiento (Hashemimajd *et al.* 2004; Rodríguez *et al.* 2008).

Justificación

En busca de una solución a la alta toxicidad de los BPC'S, se recurrió a un sistema de vermicomposteo en la cual se utilizó lombriz *Eisenia foetida*, la cual proporciona el adecuado suministro de oxígeno en el sistema.

Para poder realizar este sistema, es necesario investigar cada parte de ella, por lo que fue necesario realizar diferentes pruebas sobre los componentes del sistema los cuales son:

- Peat Moss.
- Excreta de conejo
- Lombriz (*Eisenia foetida*).

El peat moss es capaz de retener la suficiente humedad, la cual es adecuada para que los organismos dentro del sistema (lombriz y microorganismo) lleven a cabo su óptimo desarrollo.

En cuanto la excreta de conejo, está comprobado que su contenido de nitrógeno es elevado, en comparación de sus similares, la cual esta propiedad proporciona el suficiente nitrógeno para el óptimo desarrollo del sistema.

La *Eisenia foetida*, conocida comúnmente como lombriz californiana, la cual proporciona un alto grado de conversión de materia orgánica. Como sustrato permite satisfacer la demanda nutritiva del sistema

Por esto es necesario realizar un estudio sobre las propiedades de cada sustrato utilizado en el sistema, además de también análisis microbiológicos correspondientes.

Objetivos

General

- Realizar una evaluación del análisis proximal y microbiológico de los componentes del sistema de vermicomposteo, utilizado en la biorremediación para la degradación de bifenilos policlorados.

Específicos

- Realizar análisis proximales de peat moss y vermicomposta.
- Realizar la identificación de microorganismos patógenos en excreta de conejo, peat moss y lombriz (*Eisenia foetida*), tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Pseudomonas sp*.

Caracterización del área

Este proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

El laboratorio de biotecnología está dividido en tres áreas: una de siembra, una para preparar soluciones y una para pesar reactivos y muestras. Así mismo, cuenta con 4 equipos Kjeldahl, un rota vapor, dos campanas de extracción, una balanza analítica, un espectrofotómetro, una agitadora magnética, dos autoclaves, dos bombas de vacío y tres centrifugas.

Preparación de materia: en esa sección, se adaptó un área de lombricultura en donde se realizan las labores de mantenimiento de las lombrices para su desarrollo y reproducción, esta área está situada en el edificio N de la misma institución en donde se cuenta con unos recipientes hechos especialmente para la reproducción de lombrices.

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez se encuentra ubicado en carretera Panamericana Km 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Es una institución dedicada a formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora; respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos, así como también es una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprendida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región, siendo una de las más importantes del estado de Chiapas.

Problemática a resolver

Al término del proyecto " Análisis Físicoquímico y microbiológico en un sistema de vermicomposteo contaminado con BPC's", se pretende dar a conocer las propiedades físico-químicas y microbiológicas del sistema de vermicomposteo usado en la remoción o degradación de BPC's los cuales nos sirven para discutir el poder de eliminación del sistema de vermicomposteo.

Alcances y limitaciones

Alcances

Se caracterizó el peat moss el cual cumple la función de soporte dentro del sistema.

Se caracterizó a la vermicomposta realizando el muestreo al día 120.

Se logró realizar la identificación de microorganismos patógenos, con ayuda de medios selectivos.

Limitaciones

Se esperaba realizar análisis proximal, de diferentes etapas de vermicomposteo y poder realizar una estadística del comportamiento de las propiedades del sistema. Pero no hubo suficiente reactivo, con el cual realizar Las determinaciones.

En cuanto al análisis microbiológico, se presentaron limitaciones del todo físico, ya que el instituto no cuenta con la variedad suficiente de medios de cultivo. Aunque los pocos que se consiguieron, sirvieron para poder dar un resultado positivo a la parte del proyecto.

Fundamento teórico

Bifenilos policlorados (BPC's)

Los BPC's son un subconjunto de compuestos químicos orgánicos sintéticos conocidos como hidrocarburos aromáticos halogenados (organoclorados) (Lopera, 2006). Estos compuestos aromáticos están formados de manera tal, que los átomos de hidrógeno de la molécula de bifenilo (dos anillos de benceno unidos por una única unión carbono-carbono) pueden ser sustituidos por hasta 10 átomos de cloro (Ruíz, 2005).

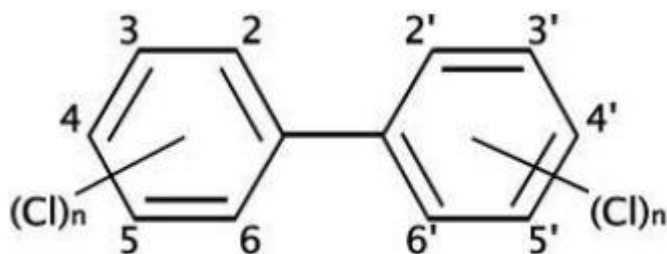


Figura 1: Imagen de la posición de cloros en el bifenilo.

En teoría existen 209 análogos, aunque en realidad han encontrado unos 130 análogos en las formulaciones químicas comerciales (Holoubek, 2000). Es característico que de cuatro a seis de los 10 posibles sitios de sustitución estén ocupados por un átomo de cloro. Los análogos de BPC's con mayor contenido de cloro son prácticamente insolubles en agua y sumamente resistentes a la degradación.

Por otro lado, los BPC's tienen 12 análogos a los que la Organización Mundial de la Salud ha asignado factores de equivalencia de toxicidad, debido a que exhiben una toxicidad parecida a la dioxina (Ruíz, 2005).

Los BPC's elaborados comercialmente tienen nombres diferentes, ejemplo, Aroclor, Clophen, etc., y cada uno de los comerciantes tiene su propia forma de nombrarlos. Para Aroclor, se utiliza un código de cuatro dígitos: los primeros dos representan al Bifenilo (12), y los últimos dos indican el porcentaje en peso del contenido de cloro de la mezcla; por ejemplo, el Aroclor 1260 es una mezcla de BPC's con un 60% de cloro (Ruíz, 2005).

Físicamente, los BPC's presentan desde aspecto aceitoso hasta resinas duras y transparentes o cristales blancos, dependiendo del grado de cloración de la molécula.

Los BPC's son compuestos persistentes, tóxicos y bioacumulativos (Vasilyeva, 2007). Generalmente, son subproductos que se generan durante una combustión incompleta, conteniéndose así en residuos como la basura, lodos de depuración, etc. (Michel, 2001). Los BPC's fueron usados en el pasado y ahora contaminan varias zonas industriales y naturales (Vasilyeva, 2007).

Estos compuestos son muy estables, por lo que no son modificados químicamente por la acción de ácidos ni bases fuertes. En la atmósfera, pueden ser atacados por radicales hidroxilo dando lugar a compuestos de degradación, y si son irradiados con UV de la longitud de onda adecuada pueden perder sus cloros, aumentando su velocidad de degradación (Holoubek, 2000).

Los BPC's pertenecen a la familia de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's), estos son contaminantes que causan un gran daño a la salud humana y al medio ambiente; son catalogados como "hidrocarburos recalcitrantes", y debido a su alto peso molecular son difíciles de remediar. Los BPC's también pertenecen al

grupo de compuestos llamados contaminantes orgánicos persistentes (COP's). (Rajiv, 2010).

Estos hidrocarburos son usados como fluidos dieléctricos debido a sus propiedades físico-químicas, gracias a esto, el sector eléctrico es uno de los principales contaminantes, pues muchos equipos como condensadores y transformadores fueron diseñados y fabricados para trabajar utilizando fluidos dieléctricos de alta concentración de BPC's (Lopera, 2006).

El consumo de los bifenilos policlorados en México se inicia prácticamente desde la década de 1940 con la importación de grandes cantidades de equipo eléctrico conteniendo estos compuestos, principalmente transformadores y capacitores entre otros. La mayor parte de los BPC's introducidos al país fueron producidos en dos plantas de los EE.UU., aunque también se importaron menores cantidades de Europa y Japón en la década de 1980, cuando su importación todavía era permitida (Cortinas, 2003).

Biorremediación y uso de lombrices

Dentro de los procesos de biorremediación mediante el uso de lombrices podemos encontrar a la vermicultura, mediante el uso del vermicomposteo.

El compostaje es un proceso aerobio, biológico, termófilo de degradación y de estabilización de materia orgánica bajo condiciones controladas (Reséndez, 2004). Vermicomposteo, es el término dado al proceso de conversión de manera biodegradable por lombrices de tierra en vermicomposta. Es la elaboración de abono orgánico a través de la utilización de varias especies de lombrices de las cuales, la más conocida y usada es *Eisenia foetida*, conocida también como "lombriz roja" o "californiana" (Durán, 2009).

El primer paso en el vermicomposteo se produce cuando las lombrices rompen el sustrato hasta pequeños fragmentos antes de ingerirlo. Esto aumenta la disponibilidad de los microorganismos y enzimas del sustrato. El sustrato es entonces ingerido y pasa por un proceso de digestión enzimática provocada por numerosas especies de bacterias y enzimas presentes en el intestino de la lombriz, finalmente la lombriz excreta vermicomposta (Gajalakshmi, 2008).

La vermicomposta (lombricomposta o humus de lombriz) es un subproducto estable tipo composta en la cual cierto tipo de lombrices de tierra (*Eisenia foetida*, *Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus*, etc.) transforman los residuos orgánicos (Soto, 2002).

En su composición están presentes todos los nutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, manganeso, hierro, cobre, zinc, carbono, etc.) en cantidad suficiente para garantizar el perfecto desarrollo de las plantas, además de un alto contenido en materia orgánica que enriquece el suelo y favorece la circulación de agua y aire.

Debido a sus agentes biológicos, químicos y acciones físicas, las lombrices pueden ser empleadas directamente para promover la biodegradación de contaminantes orgánicos en los procesos de biorremediación (Hickman, 2008).

Las lombrices de tierra han demostrado su potencial de airear el suelo, y por tanto, mejorar su estado nutricional y fertilidad, variables conocidas para limitar las velocidades de biorremediación. Las lombrices de tierra dificultan los procesos en los que los contaminantes orgánicos se unen al suelo y promueven así, la dispersión y biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos para la degradación de los microorganismos (Hickman, 2008).

Las lombrices de tierra en general, son tolerantes a muchos contaminantes químicos, incluyendo los metales pesados y los contaminantes orgánicos del suelo y estos pueden acumularse en sus tejidos (Zachary, 2008).

Por lo tanto, mediante el uso de estas excelentes propiedades de las lombrices de tierra, el proceso de vermicomposta ha sido empleado para la degradación de contaminantes orgánicos como PAH's, BPC's, etc. (Contreras, 2009).

En el caso particular del vermicomposta también llamado lombricomposta, el proceso consiste en la bio-oxidación y estabilización de los sustratos orgánicos a través de la acción descomponedora conjunta de lombrices y microorganismos, que lo convierten en un material humificado y mineralizado (Martínez 1996, Domínguez *et al.*1997, Bollo 1999).

Las deyecciones de la lombriz poseen una riqueza en flora bacteriana muy grande, con cerca de 2×10^{12} colonias g^{-1} de humus producido, en vez de los pocos centenares de millones presentes en la misma cantidad de estiércol fermentado. Ello permite la producción de enzimas importantes para la evolución de la materia orgánica cuando este material es aplicado al suelo (Ferruzi 1986).

Según Bollo (1999), el vermicompostaje tiene un marcado efecto sobre la transformación del N en los materiales iniciales. La mineralización del N fue mayor en presencia de lombrices, lo que sugiere que estas producen condiciones que favorecen la nitrificación, excretando también una cantidad importante en forma de amonio y muco-proteínas.

El humus de lombriz está compuesto por C, O₂, N, así como macro y micro nutrientes en diferentes proporciones, tales como Ca, K, Fe, Mn y Zn entre otros. Los contenidos finales por tonelada de material dependerán básicamente de la fuente de origen y la humedad del material cuando el proceso finaliza (Fraile y Obando 1994).

Desde el punto de vista microbiológico, se ha puntualizado que el vermicompost posee una gran riqueza de microorganismos así como un efecto supresor sobre algunos patógenos del suelo (Ramírez 1996, Domínguez *et al.* 1997). Estudios realizados por Werner y Cuevas (1996) muestran la ausencia de patógenos humanos como *Salmonella* y *Escherichia coli* según el tipo de microorganismos presente en los materiales.

Algunos autores mencionan que las propiedades nutricionales del vermicompost pueden variar mucho entre sí (Werner y Cuevas 1996, Ferruzi 1986, Bollo 1999). Esto se debe a los tipos de desecho utilizados, las proporciones de cada uno, el estado de descomposición de estos materiales, las condiciones en las cuales se lleve a cabo el vermicompostaje y el tiempo de almacenamiento (Chacón y Blanco 1999).

Ferruzi (1986) y Martínez (1996), concuerdan en que el conjunto de características Químicas, físicas, y microbiológicas, son las que determinarán la calidad final y en consecuencia el uso apropiado de estos productos en los diferentes cultivos.

Debido a lo anterior se planteó esta investigación que tuvo como objetivo caracterizar química, física y microbiológicamente las vermicompostas elaborados a partir de 2 diferentes sustratos.

Procedimiento y descripción de actividades realizadas

Análisis proximal del peat moss

Determinación de humedad

Determinación de la humedad de acuerdo a lo establecido por el método de la *AOAC.2005.950.46B*. Para llevar a cabo esta determinación, se tomaron muestras homogenizadas de Peat Moss.

Se tomaron 5 g de muestra y se colocaron en crisoles a peso constante (por triplicado), para la eliminación de la humedad, se introdujeron en un horno a una temperatura de 70°C. Pesando las muestras a cada 3 h durante 24 h.

La diferencia de peso obtenida de la muestra húmeda y la seca, es el contenido de humedad.

Determinación de cenizas

Esta determinación se realizó de acuerdo a lo establecido por el método estándar de la *AOAC.1990.942.05*. El método aquí presente es empleado para la determinación de cenizas en las muestras expuestas a calcinación; considerando a estas, como el contenido de minerales totales o material inorgánico en la muestra.

En un crisol de porcelana previamente llevado a peso constante, se colocaron 10 g de muestra seca, para posteriormente calcinarlo mediante una mufla con una

temperatura entre 550°C a 600°C de 2 a 4 h. Después de notar que las cenizas cambian de color negro a blanco, se extrajo de la mufla y se colocó en un desecador durante 20 minutos aproximadamente, enseguida se realizó el pesado.

Determinación de extracto etéreo

Para la determinación de extracto etéreo y con la única finalidad de conocer la cantidad de grasa presente en la muestra, se siguió con lo establecido por el método estándar de la AOAC.960.39B.

Se llevó el matraz bola a peso constante a una temperatura de 60°C y en el cartucho whatmann se pesó de muestra seca aproximadamente 5 g, para después colocarlo en el equipo de extracción. Para montar el equipo (soxhlet) se colocó vaselina en todas sus uniones y se llenó el depósito con el suficiente volumen de éter de petrolero para realizar dos sifones. Posteriormente se llevó a ebullición durante 8 horas. Tomando el tiempo desde el primer reflujo del solvente.

Al término de la extracción los cartuchos y el matraz balón se colocaron en una campana de extracción, para evaporar el éter petróleo contenido en su superficie, esto se realizó durante 24 h. Pasado el tiempo se llevaron los cartuchos con las muestras libres de éter de petróleo a una estufa para lograr un peso constante, a 60°C durante aproximadamente 6 h para luego pesarlos.

Determinación de proteínas

Determinación de proteínas de acuerdo a lo establecido por el método estándar de la AOAC (2005.928.08) "Kjeldahl "

Digestión

Se pesó 0.05 g de muestra seca y desengrasada en papel arroz libre de nitrógeno, 0.5 g de mezcla catalizadora y 0.3g de K_2SO_4 , se colocó en un matraz micro Kjeldahl y agregaron 5 mL de K_2SO_4 , posteriormente se colocaron los matraces en la parrilla de digestión. (Se calentó primero a baja temperatura y se va aumentando paulatinamente hasta alcanzar la máxima girando ocasionalmente el matraz). Se mantener a temperatura máxima de 4 a 6 horas girando ocasionalmente, hasta tener una solución verde claro. Se pasó a un matraz balón con salida lavando con pequeñas cantidades de agua destilada para pasar toda la solución antes digestiva.

Destilación

Se agregaron 60 mL de agua destilada al matraz macro- Kjeldahl 20 mL de NaOH al 40 % y 1 mL de sulfato de potasio al 10 % y se colocó en la parrilla, se sellaron con teflón todas las uniones para evitar pérdidas de vapor.

Se prepararon 50 mL de ácido bórico al 4 % en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se agregaron 10 gotas de mezcla de indicadores (Shiro-Tashiro). El matraz se colocó en la salida del intercambiador de calor procurando que el extremo quede sumergido en la solución.

Una vez que se instaló correctamente el equipo, se comenzó la destilación inmediatamente, la destilación se detuvo hasta obtener aproximadamente 50 mL de destilado. Se Lavó el intercambiador de calor con agua destilada y se recogió en el mismo matraz. El destilado se tituló con ácido clorhídrico.

Titulación

La titulación se llevó a cabo con HCl al 0.1 N, el cual fue colocado en una bureta de 10 mL. Se detuvo la adición de HCl al ocurrir el vire de color verde a morado, el cual indica la neutralización del ion Borato.

Análisis microbiológico

Técnica de muestreo.

En el análisis microbiológico, la adecuada selección de la muestra, la toma correcta y los medios de conservación y su transporte hacia el laboratorio, son de primordial importancia para obtener resultados significativos y confiables; por lo que la técnica de muestreo se llevó a cabo con forme a la NOM-109-SSA1-1994 la cual indica que todos los materiales deben estar limpio, estéril y libre de sustancias que pudiera afectar la viabilidad de los microorganismo.

El material para la toma de muestra fue previamente esterilizado, envuelto en papel estraza seguida con papel aluminio. Los francos para la toma de muestra fueron previamente esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para la toma de muestra fue necesario colocarse cubre boca, cofia, bata y en su caso hubo contacto directo con las manos, fue necesaria la utilización de guantes estériles, al colocarlos dentro de los frascos estériles.

Se tomaron muestra de peat moss, excreta de conejo y lombrices (*Eisenia foetida*), las cuales para su uso experimental se dividieron en 3 muestras, con proporciones similares.

El pesaje se llevó a cabo en balanza granataria marca OAHUS modelo Triple Beam Balance con capacidad de 2610 g, en el cual se pesaron 10 g de excreta, 10 g de lombriz y 8.5 g de excreta y 1.5 g de Peat Moss, la cual se obtuvo una relación de 85 % de Excreta y 15% de Peat Moss.

Todas las muestras fueron transportadas en frío, para su adecuada conservación durante el trayecto al laboratorio.

Preparación de diluciones

La preparación de las diluciones se llevaron a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, la cual está orientada a proporcionar las guías generales para la preparación de diluciones para el examen microbiológico

.

La dilución primaria tiene por objeto obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis.

La preparación de diluciones decimales adicionales, si son necesarias, tiene como objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir, después de la incubación, la observación de la prueba en el caso de tubos o matraces y la cuenta de colonias en el caso de placas.

Para las diluciones se preparó una solución de agua peptonada, con el fin de acostumbrar a los microorganismos a su nuevo entorno y se esterilizó para su uso inmediato.

Las muestras fueron pesadas y se agitaron 25 movimientos hacia arriba y 25 movimientos hacia abajo con un arco de 30 centímetros y con la finalidad de homogenizar la muestra, enseguida se colocaron 90 mL de Agua peptonada, la cual se procedió a homogenizar licuando por 1 minuto, para se utilizó un licuadora marca Oster. Se permite que las partículas grandes sedimenten y se toma un

muestreo de la capa superior de la suspensión para las posteriores diluciones. A esta suspensión se le conoce como dilución madre.

Preparación de las diluciones decimales adicionales

Para las siguientes diluciones se procedió a transferir 1 mL de la solución madre a múltiples tubos de ensaye previamente llenados con 9 mL de agua peptonada y esterilizados.

Las diluciones se llevaron hasta un coeficiente de 10^{-7} , la cual es necesaria para realizar las demás etapas.

Metodología del aislamiento e identificación.

Para esta parte del proceso se dividió en 4 puntos principales y fundamentales, ya que se vuelven indispensables para la correcta identificación de las bacterias.

Pasos para la identificación:

Paso 1: Pre-enriquecimiento.

En este paso el pre-enriquecimiento, se emplea un medio de cultivo no selectivo, el cual tiene objetivo de restaurar las células dañadas de los microorganismos para su correcto crecimiento. En este caso se utilizó agua peptonada, para ayudar a los microorganismos presentes en la muestra a llegar a una fase de adaptación a su nuevo ambiente.

Se preparó agua peptonada, agregando 15 g de medio para preparar agua peptonada en 1 L de agua.

Paso 2: Enriquecimiento selectivo

En esta paso el enriquecimiento selectivo empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de nuestra bacteria en particular y nos ayuda a inhibir otros organismos presentes en la muestra.

El medio de enriquecimiento selectivo utilizado en el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* se utilizó caldo selenito y cistina el cual se preparó de la siguiente forma.

Se disolvió 2.3 g en 100 mL de agua previamente esterilizada en un matraz de 250 mL, inmediatamente se calentó ligeramente hasta obtener la disolución total, se colocaron porciones de 9 mL en cada tubo de ensaye por triplicado y se esterilizaron en baño maría por 5 minutos. No se esterilizo en autoclave ya que si se sobrecalienta, el caldo pierde su poder selectivo.

Este caldo no inhibe *Pseudomonas* y fue utilizado para realizar la identificación de esta.

Para el aislamiento de E coli se utilizó caldo lauril sulfato de sodio el cual se suspendió 3.56 g en 100 mL de agua destilada en un matraz de 250 mL, posteriormente se distribuyó 9 mL de caldo en tubos de ensaye con rosca y campana de Durham, la cual posteriormente se procedió a esterilizar en autoclave a 121°C a 15 libras por 15 minutos.

Paso 3: Selección en medios sólidos

En este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a nuestra bacteria en particular y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

Para el caso de *Salmonella* y *Shigella* se preparan 3 medios de cultivo los cuales son considerados el test *Salmonella-Shigella* por su alta confiabilidad. Los medios son los siguientes:

Agar *Salmonella-Shigella* (SS)

Se suspendió 6 g en 100 mL de agua previamente esterilizada, la cual se llevó a una agitación constante hasta la ebullición por 1 minuto. se dejó enfriar y se distribuyó sobre las placas de Petri estériles. No se esterilizó ya que pierden su poder inhibidor.

Agar Verde Brillante (VB)

Se suspendió 5.8 g en 100 mL de agua destilada en un matraz de 250 mL, el cual se calentó y agito hasta ebullición por 1 minuto. Se dejó enfriar y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos para posteriormente se distribuir en placas Petri esterilizadas.

Agar XLD

Se suspendió 5.52 g en 100 mL de agua esterilizada, se calentó hasta llevarlo a ebullición por 1 minuto, se transfirió a un bañía maría a 50°C por 5 minutos y dejar enfriar. No se esterilizo. Se colocó en cajas Petri esterilizadas.

Para el caso de *Escherichia coli* los medios utilizados para la identificación son medios que se utilizan comúnmente para la identificación de coliformes y la identificación se lleva acabo de forma visual, dependiendo de los ingredientes de cada Agar es la coloración que se va a determinar a las 24 h.

Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

Se suspendió 3.6g de medio en 100 mL de agua destilada, la cual se agito hasta llevar a ebullición y se mantuvo así durante 1 minuto. Esterilizo en autoclave a 121°C por 15 minutos. Por consiguiente se pospuso a distribuir sobre placas Petri esterilizadas.

Agar MacConkey

Se suspendió 5g en 100 mL de agua destilada, se calentó y se agito hasta llevarlo a ebullición. Se esterilizo por 15 minutos a 121°C y se procedió a distribuir sobre placas Petri dejándolas solidificar parcialmente destapadas.

Agar *Escherichia coli* Directo (ECD)

Se suspendió 5.31 g del medio en 100 mL de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Se calentó agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Se esterilizo en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Se conservó en refrigeración de 2° a 8°C.

Paso 4: Identificación bioquímica

En este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos. No se realizó.

Resultados

Composición de los componentes del sistema en base seca.

En la siguiente tabla se muestran los resultados en porcentajes de cada análisis hecho a cada uno de los componentes del sistema, los cuales son , la cantidad de humedad, la cantidad de cenizas y materia orgánica, la cantidad de grasas y por consiguiente nitrógeno.

Tabla 1: Resultados de los análisis de peat moss, vermicomposta y excreta de conejo.

ANÁLISIS	Peat Moss	Vermicomposta	Excreta de conejo
HUMEDAD (%)	33.3985 + 0.3146	78.1962 + 0.2746	23.2
CENIZAS (%)	6.4018 + 1.0219	33.9088 + .02181	19.2
MATERIA ORGÁNICA (%)	93.5982 + 1.021	66.0911 + 0.2181	80.8
GRASAS (%)	1.5517 + 0.4329	1.8652 + 0.1469	1.86
NITRÓGENO (%)	3.451 + 0.99	2.42%	1.4

En un proyecto anterior se realizó el análisis a la composición de uno de los componentes del sistema, el cual es la excreta de conejo, como fuente principal de nitrógeno y carbono para la sobrevivencia y metabolismo de la lombriz.

Resultados teniendo como variables el número de lombrices

Inmediato a esto se realizaron análisis a muestras, donde el tiempo de vermicomposteo era distinto, con lo cual se buscaba alguna tendencia del tiempo sobre las diferentes características del sistema en cuanto a su composición.

Teniendo como variables el número de lombrices empleado en el sistema de vermicomposteo se obtuvieron los siguientes datos:

3 lombrices

Humedad

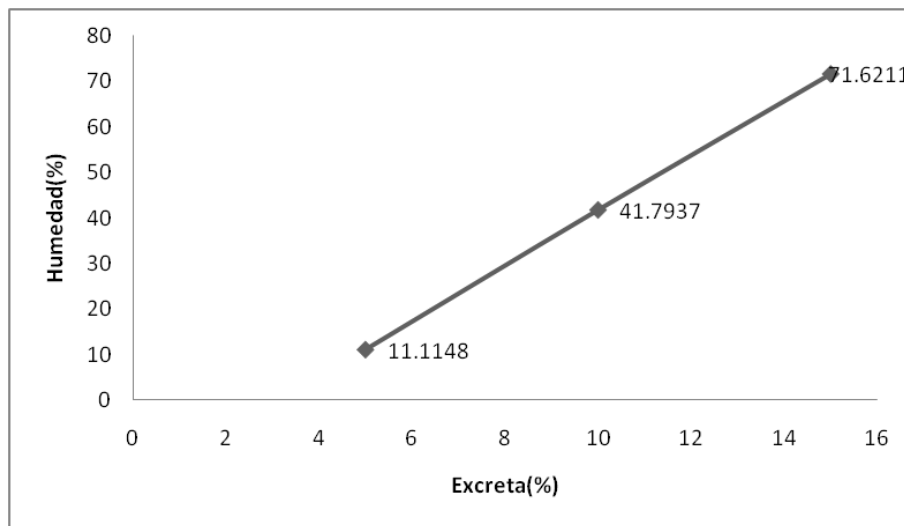


Figura 2: Relación del porcentaje de excreta y el porcentaje de humedad en un sistema de 3 lombrices.

En la Figura 1 se puede observar una clara tendencia de la humedad con respecto a la cantidad de excreta, la cual indica una relación proporcional. Aunque el peat moss es un excelente soporte el cual puede absorber humedad hasta 20 veces su propio peso, esto indica que la resistencia de la excreta a perder humedad.

Cenizas y materia Orgánica.

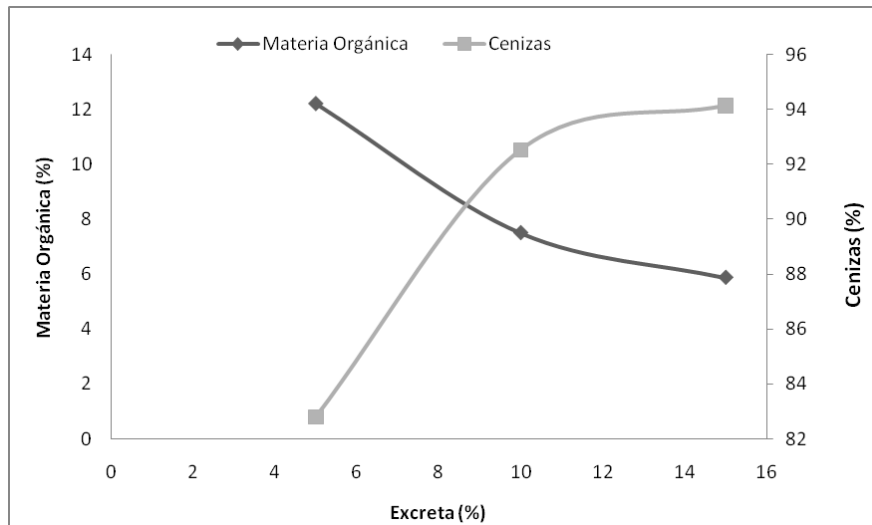


Figura 3: Relación de Cenizas (%) y Materia Orgánica (%) con respecto al porcentaje de excreta en un sistema con 3 lombrices.

En la Figura 2 se puede observar claramente la tendencia de material orgánico presente en un sistema de 3 lombrices y que ha llevado un proceso de vermicomposteo de 72 días, los cuales no son suficientes para degradar la gran parte de materia orgánica presente.

Por otra parte, el porcentaje de cenizas presentes son mucho menor, si la cantidad de excreta va en aumento.

Extracto etéreo

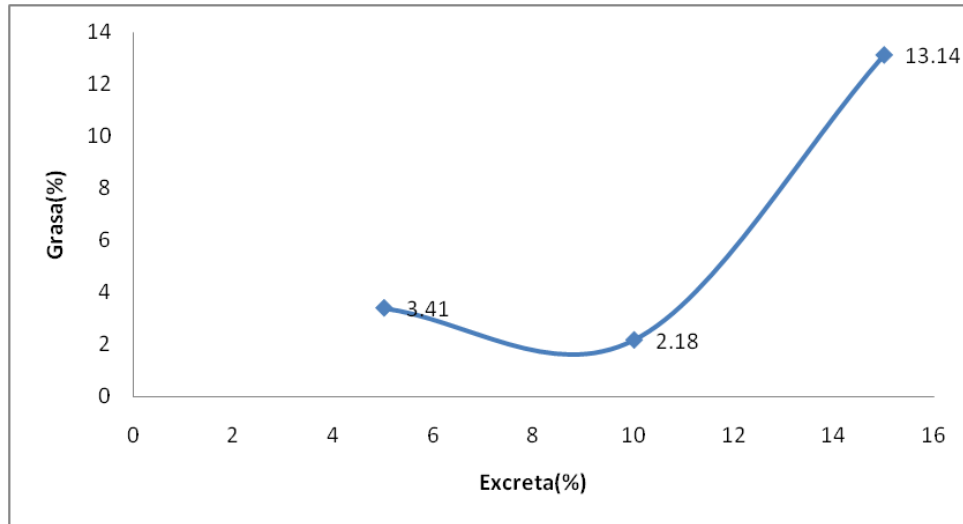


Figura 4: Relación que existe entre la cantidad de Excreta (%) y la cantidad de Grasas (%) en un sistema de 3 lombrices.

En la figura 3 se puede observar un pequeño descenso en la cantidad de grasas con respecto a la proporción de excreta, la cual es del 10%. Sin embargo cuando la cantidad de excreta es del 15%, la cantidad del extracto etéreo aumenta hasta un poco más del cuádruple de su valor que existe en el 5%.

5 lombrices

Humedad

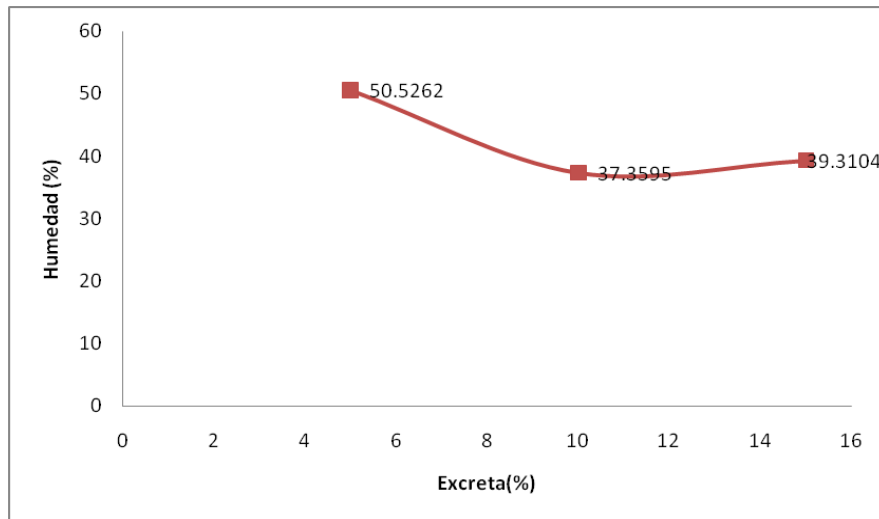


Figura 5: Relación de excreta de conejo (%) y la Humedad (%) contenida en un sistema de vermicomposteo con 5 lombrices.

En la figura 4, se observa la turbulencia que sufre la humedad en porcentaje con respecto a la cantidad de excreta (%), en el porcentaje de 5% de excreta la humedad es del 50% y en 15% de excreta existe una humedad del 39%. Estos resultados suelen ser contradictorios con el sistema 3 lombrices, ya que en este caso, el aumento de la concentración de peat moss es proporcional al aumento de Humedad.

Cenizas y materia Orgánica.

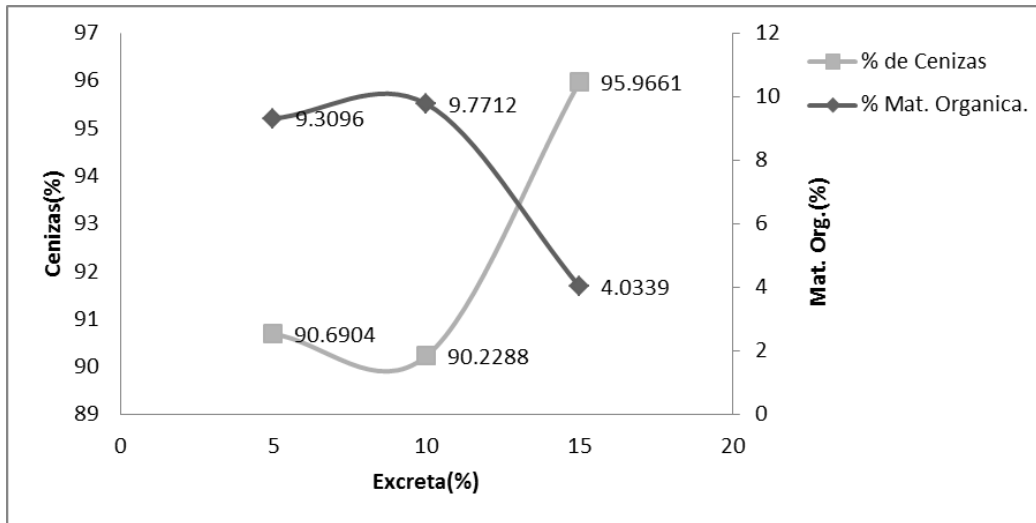


Figura 6: Relación de la cantidad de cenizas (%) y Materia Orgánica (%) contra la cantidad de Excreta de Conejo dentro de un sistema de vermicomposteo con 5 lombrices.

En la figura 5 se observan claramente la relación proporcional que existe entre la cantidad de excreta en forma de porcentaje, con respecto a el material orgánico disponible en ese momento dentro del sistema, el cual se considera muy poco, y es que esto es muy obvio, al tener dentro del sistema un número mayor de lombrices, más rápidamente se va a dar la degradación de materia orgánica.

Extracto etéreo

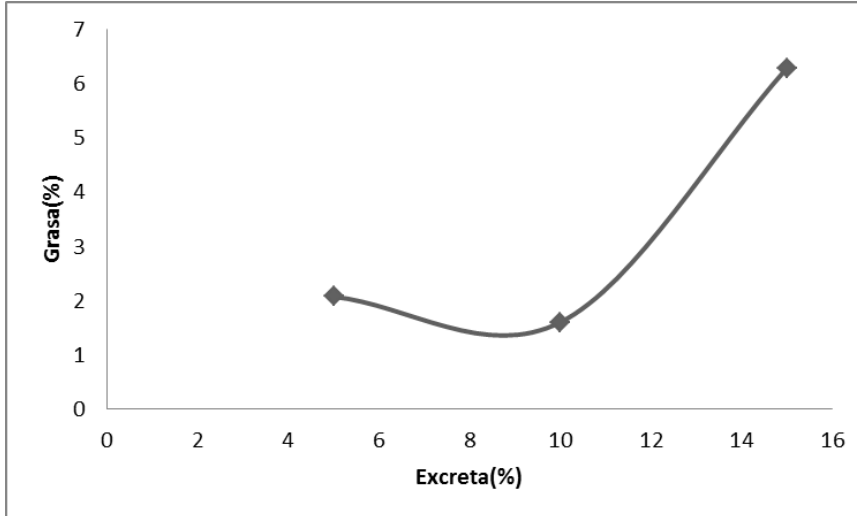


Figura 7: Relación que existe entre la concentración de excreta (%) y la de Grasas (%) en un sistema de vermicomposteo con 5 lombrices.

En la figura 6, se aprecia la cantidad máxima de grasa presente en la muestra la cual alcanza un dato de 6.28% en base seca, comparándola con la primera concentración del 15% observamos cumple con su regla de proporcionalidad. Aunque esta regla no se aplicó durante la concentración del 10%.

7 Lombrices

Humedad

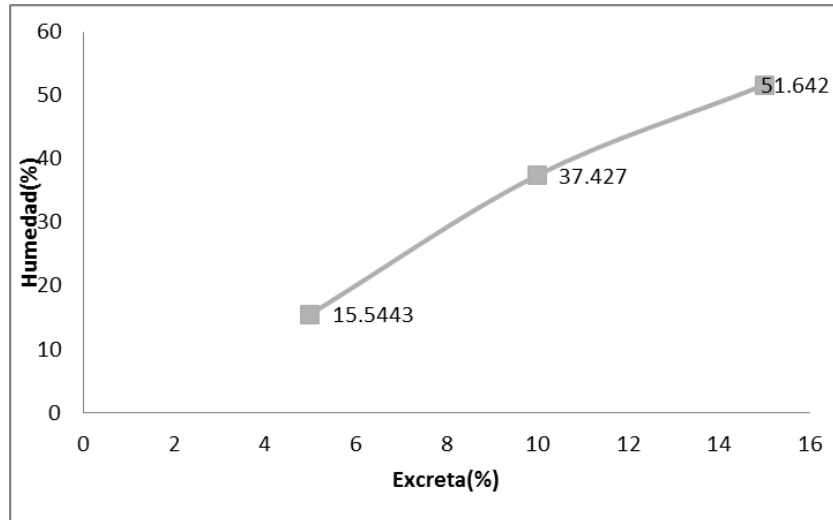


Figura 8: Relación de la cantidad de Excreta (%) y la cantidad de Humedad (%) en un sistema de vermicomposteo de 7 lombrices.

En este nuevo sistema de 7 lombrices, podemos darnos cuenta que la relación que existe entre la concentración (%) de excreta y Humedad, son totalmente proporcionales, ya que existe una estrecha relación, por la facilidad de la excreta de retener humedad, aun por haber pasado por un proceso de secado.

Cenizas Y Materia Orgánica

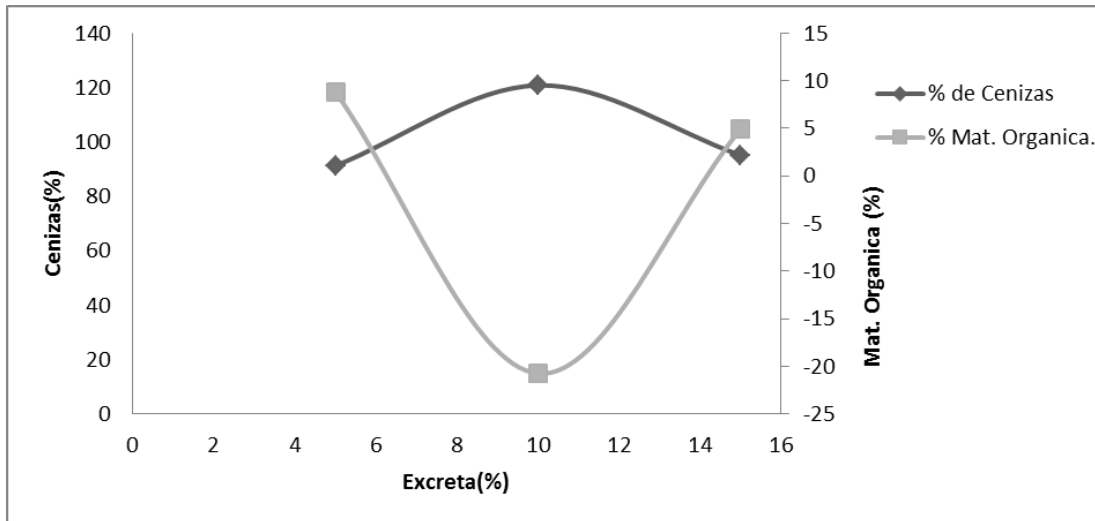


Figura 9: Relación de la cantidad de cenizas (%) y Materia Orgánica (%) contra la cantidad de Excreta de Conejo dentro de un sistema de vermicomposteo con 7 lombrices.

En la figura 8 se observa el porcentaje de materia orgánica que es degradada por 7 lombrices en 72 días. Cuando la excreta es expuesta a un porcentaje de 10% y es colocado es las muestras sucedió un error de medición y aprecia claramente en la figura, la cual nos indica un porcentaje de materia orgánica por debajo del 0% y eso es prácticamente imposible, pero a comparación de los demás puntos de la gráfica, podemos apreciar que tiene una tendencia a cero.

Extracto Etéreo

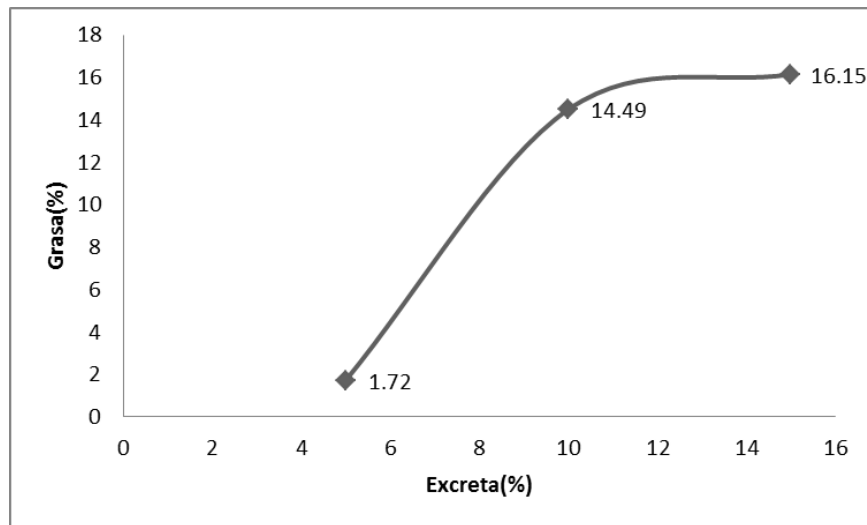


Figura 10: Relación que existe entre la concentración de excreta (%) y la de Grasas (%) en un sistema de vermicomposteo con 7 lombrices.

En la figura 9 se puede apreciar la cantidad de grasa relacionada con la cantidad de excreta en la muestra, apareciendo como valor máximo en la concentración de 15% con un valor de 16% de grasa en base seca, sin embargo en donde la concentración de excreta es la mínima, es decir del 5%, el porcentaje de grasa resulta ser el mínimo de un 1.72%.

Resultados Microbiológicos.

Para los análisis microbiológicos, el sistema se dividió en 3 tipos de muestras las cuales son las siguientes:

- Análisis de Excreta.
- Análisis de Lombriz.
- Análisis de la relación Peat Moss (15%) y Excreta (85%).

Identificación microbiológica en Excreta de conejo.

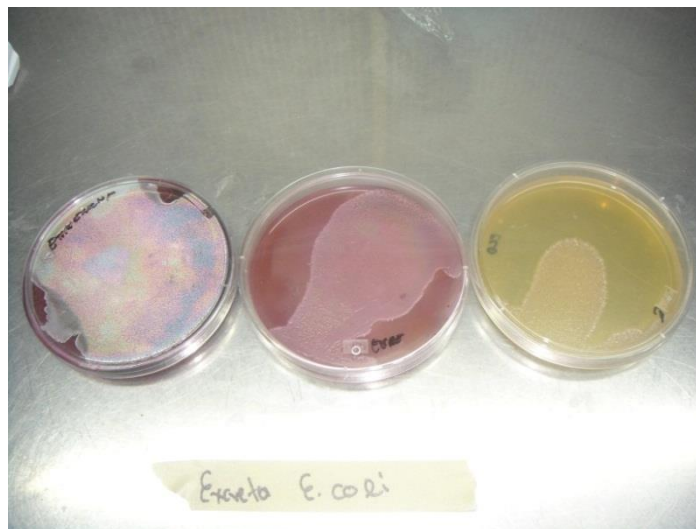


Figura 11: Fotografía que muestra los 3 tipos de medios de cultivo utilizado en la identificación de la bacteria e. coli.

En la figura 10, se muestran los 3 tipos de agar que se usaron para poder identificar al microorganismo *Escherichia coli* en excreta de conejo la cual nos da la seguridad de poder identificar a nuestro microorganismo ya que son medios selectivos diferencial, y podemos de acuerdo a sus características mencionar la presencia positiva o negativa de esta.

La identificación de *Escherichia coli* en agar EMB, se aprecia un crecimiento bacteriano, pero este no es de *Escherichia coli*, ya que la bacteria *Escherichia coli* por ser fermentadora de lactosa, exhibe un brillo verde metálico, el cual es característico en esta bacteria, la cual no se presentó, por este motivo la placa es negativa.

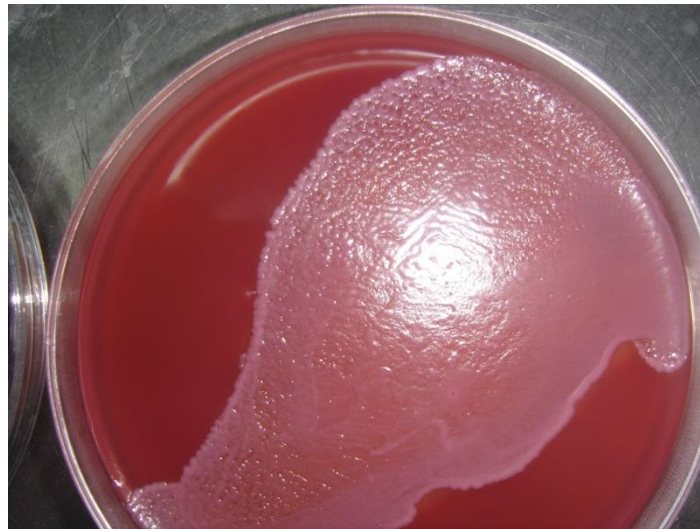


Figura 12: Fotografía de crecimiento Bacteriano, en agar MacConkey en busca de la identificación de *E. coli*.

En la figura 11 se muestra un amplio crecimiento bacteriano, los cuales tiene como característica color rojo, la *Escherichia coli* es un microorganismo que es capaz de fermentar la lactosa, principal carbohidrato en el agar MacConkey, el cual nos arroja un viraje en el color a rojo.

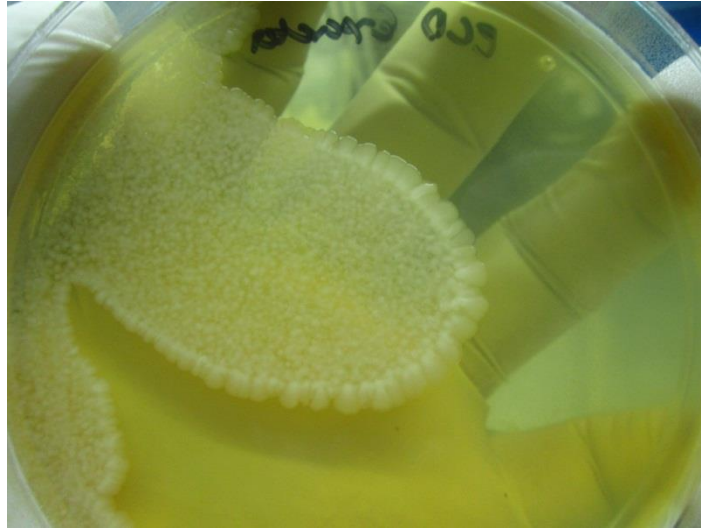


Figura 13: Fotografía tomada al medio ECD con un crecimiento bacteriano, en la identificación de *Escherichia coli* en excreta de conejo.

En la figura 12 se aprecia crecimiento bacteriano, el cual nos indica la presencia de cierto microorganismos, pero en el caso de *Escherichia coli* debe de provocar fluorescencia al iluminas con luz UV de 366 nm. En el caso de la excreta de conejo si existe la presencia de dicha bacteria por la fluorescencia es positiva la cual se aprecia en la siguiente figura, en al cual se compara con una muestra negativa.



Figura 14: Fotografía tomada en la cámara de luz UV, en la cual se manifiesta la presencia de fluorescencia a una longitud de 366 nm.

La figura 13 muestra claramente la característica del medio ECD, el cual es capaz de ser fluorescente si en este caso es invadido por *Escherichia coli*. El sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucorónido (MUG), es separado por la enzima β -D-glucuronidasa de *Escherichia coli* dando lugar a la formación de 4-metilumbeliferona, que se caracteriza por ser fluorescente al irradiar con lámpara de luz UV de 366 de 366 nm.

En este caso la placa fluorescente es la de nuestra muestra con excreta y es comparada con una muestra negativa.

Identificación de *salmonella* y *Shigella*.

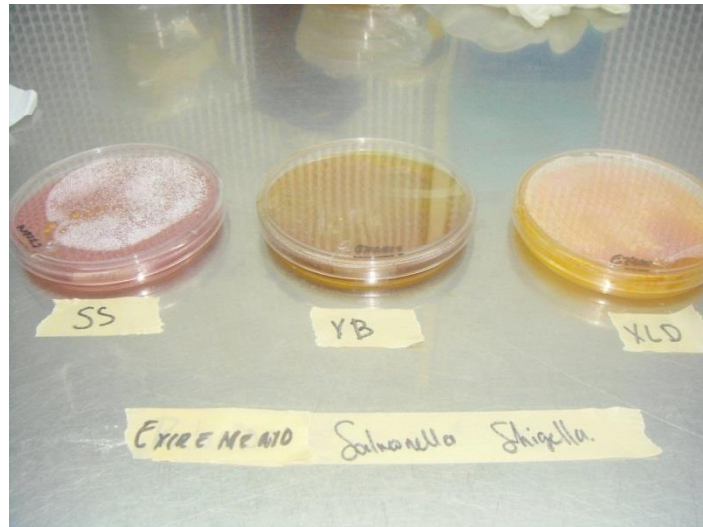


Figura 15: Fotografía que nos muestra los 3 tipos de agares implementados para la identificación de Salmonella y Shigella en la excreta de conejo.

En la figura 14 se muestra los 3 agares diferentes, los cuales nos sirven para identificar la presencia de *Salmonella* sp y *Shigella* sp. Dentro de las características de estos medios es que, el grupo conformado por estos 3 se les denomina "*test salmonella-shigella*".

De acuerdo a los ingredientes que contiene cada agar, nos da una seguridad de identificación al momento de realizarlo visualmente, estos medios fueron incubados a una temperatura de 36°C por 24 horas.

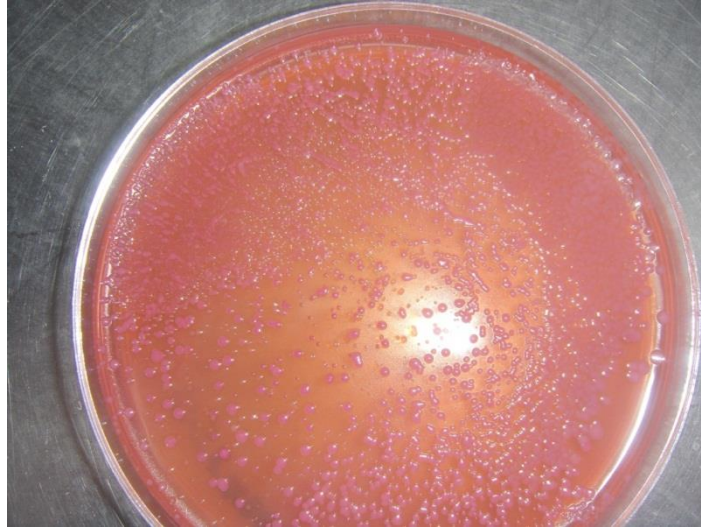


Figura 16: Fotografía que muestra crecimiento bacteriano, inoculado con muestra de excreta de conejo.

En la figura 15 se muestra crecimiento bacteriano, la cual denota un color de rosa a rojo, color característico del crecimiento de *Escherichia coli* en agar SS, el cual no fue totalmente inhibido en la parte de enriquecimiento selectivo.

La placa de agar verde brillante muestra el crecimiento bacteriano de una muestra de excreta de conejo, la cual se detectó la presencia de *Salmonella* sp la cuales se identifican por ser colonias rosas, blancas o transparentes sobre fondo rojo.

Debido a las características del medio el crecimiento de *Shigella flexneri* es inhibido, así como el de *Salmonella typhi*.

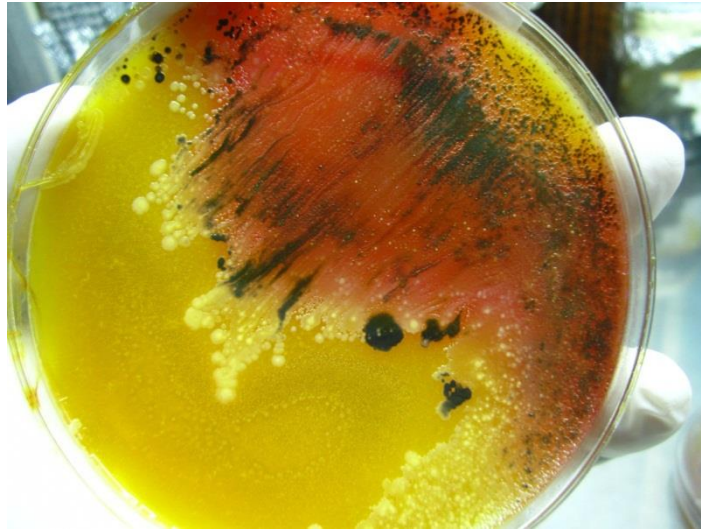


Figura 17: Fotografía tomada de agar XLD el cual fue inoculado con muestra de excreta de conejo.

La figura 16 nos muestra el resultado de la inoculación de excreta de conejo, el color original del medio es rojo, por la combinación de los carbohidratos (Xilosa, lactosa y sacarosa). La degradación de los carbohidratos, acidifica el medio el cual hace un viraje el rojo de fenol a amarillo.

Las colonias características de *Shigella* son transparentes y como son incapaces de degradar los carbohidratos presentes en el medio, hace parecer el color de las colonias rojas.

Las colonias típicas de la *Salmonella* son de color rojo con el centro negro debido a la producción de H₂S. Mientras que las de *Escherichia coli* son grandes, amarillas con o sin precipitado de bilis.

Identificación de *Pseudomonas* en excreta de conejo.

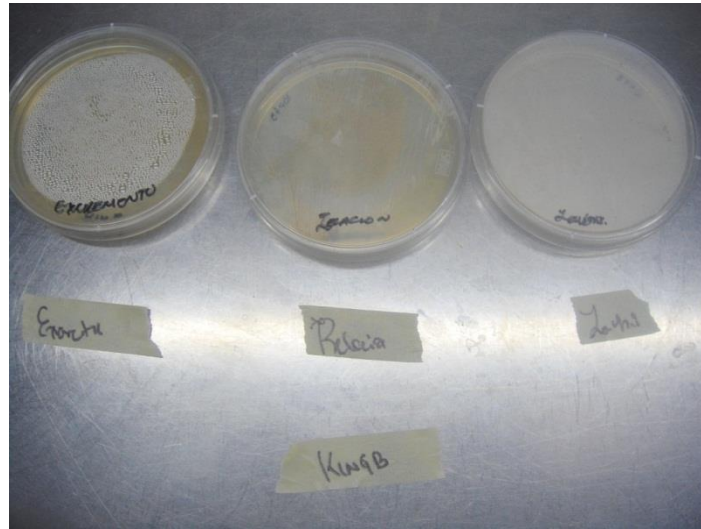


Figura 18: Fotografía tomada de 3 placas de agar King B.

En la figura 17 se muestran las 3 placas de agar King B que se utilizaron para la incubación de las muestras de Excreta de conejo, Lombriz y relación de Excreta-Peat Moss.

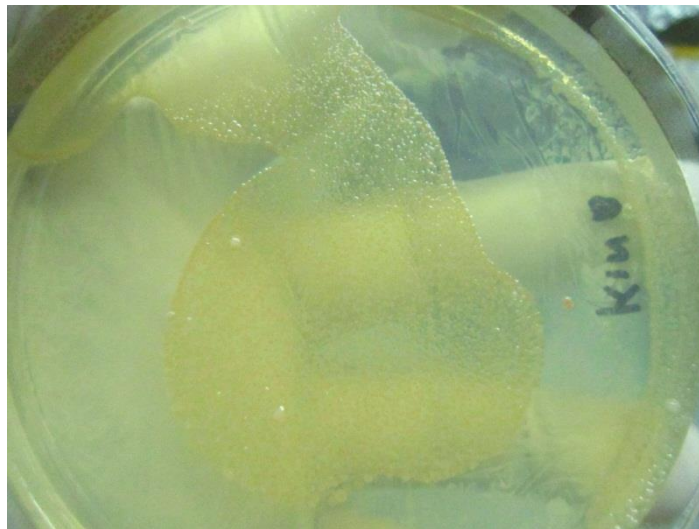


Figura 19: Fotografía tomada de la incubación de excreta de conejo por 24 h. en medio King B, para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la figura 18 podemos observar crecimiento bacteriano, en un medio King B, el cual por sus características es altamente selectivo para *Pseudomonas aeruginosa* y en general para el género *Pseudomonas*.

El medio King B, es un medio que sirve para la detección e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* de otras *Pseudomonas* basados en la producción de fluorescencia.

Hay *Pseudomonas* que elaboran fluoresceína sin piocianina, otras elaboran sólo Piocianina y otras que elaboran las dos. El Medio King B potencia la producción de Fluoresceína e inhibe la de Piocianina, mientras que King A potencia la producción de Piocianina e inhibe la fluoresceína.

Ambos colorantes se difunden en el medio dando una coloración amarilla fluorescente (la Fluoresceína) y azul (la Piocianina).

En este caso no se produjo fluorescencia pero si crecimiento bacteriano, el cual se puede concluir que es *Pseudomonas*, aunque no de la especie *aeruginosa*.

Identificación microbiológica en lombriz (*Eisenia foetida*).



Figura 20: En la fotografía se presentan los diferentes agares utilizados en la identificación de e. Coli en Eisenia Foetida.

La lombriz (*Eisenia foetida*), es uno de las especies más utilizadas en la lombricultura, por este motivo es de vital importancia identificar los posibles microorganismos que se encuentren a su alrededor, los cuales implican dentro de ellas a la *Escherichia coli*.

En la figura 19 se observan 3 tipos de agares utilizados comúnmente para identificación de *Escherichia coli*, los cuales son los siguientes:

- Agar MacConkey
- Agar Eosina azul de metileno.
- Agar *Escherichia coli* Directo.

La identificación de *Escherichia coli* en agar EMB se presentó de forma positiva, esperaban colonias color negro-azulado, con un característico brillo verde metálico el cual nunca se presentó.

En el agar MacConkey las colonias fueron de un aspecto característico el cual presentaban colonias rojas y un halo turbio alrededor además que se presentó en cantidad a abundante tal como lo describe Bollo (1999).

En agar ECD las colonias presentaron la fluorescencia característica de la presencia la del enzima β -D-glucuronidasa en el medio, esta fluorescencia se observó gracias a la lámpara de UV con una longitud de onda de 366nm, tal y como se aprecia en la figura siguiente.

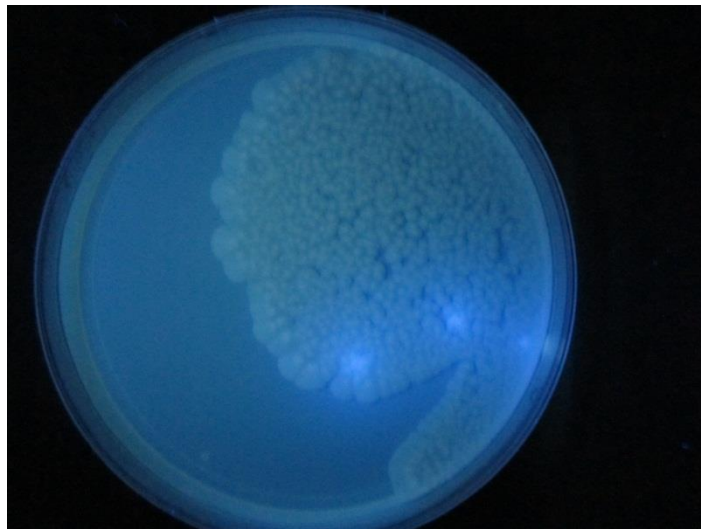


Figura 21: Presencia de fluorescencia en medio ECD el cual actúa a una longitud de onda de 366 nm.

En la parte de la identificación de *salmonella* y *shigella* se llevaron a cabo conforme al test *salmonella* los cuales constituyen 3 agares selectivos diferenciales y que son de gran importancia en la rama microbiológica los cuales son:

- Agar SS
- Agar Verde Brillante
- Agar XLD.



Figura 22: En la fotografía se aprecia el Test Salmonella-Shigella el cual consta de 3 agares selectivos-diferenciales.

Por parte de la identificación en el agar *Salmonella-Shigella* (SS) la presencia de *salmonella* es incolora ya que son incapaces de fermentar la lactosa, y es por esto que ocurre la identificación con otras bacterias como la *Escherichia coli*.

La presencia de estos patógenos indican que los sustratos no se encuentran estables biológicamente, debido a que la materia orgánica no se ha descompuesto en su totalidad. Tal como Gutiérrez (2011) menciona, estos microorganismos pueden aprovechar aun la materia orgánica presente y reducir el tiempo de vermicomposteo.

En el agar verde brillante la aparición de las colonias fueron transparentes y de fondo rojo por el color característico del medio, acompañada de pequeñas colonias de fondo amarillo ocurrido por el cambio de pH que fue debido a la hidrólisis de los carbohidratos.

Por su parte en el agar XLD, se presentó colonización de diferentes bacterias las cuales se identificaron gracias al vire de color del medio ya que este medio es rojo por tanto las colonias son transparentes, en el caso de *salmonella*, en el caso de *shigella* esta tiene una producción de H_2S y por tanto tiene una un centro negro como se muestra en la siguiente imagen.

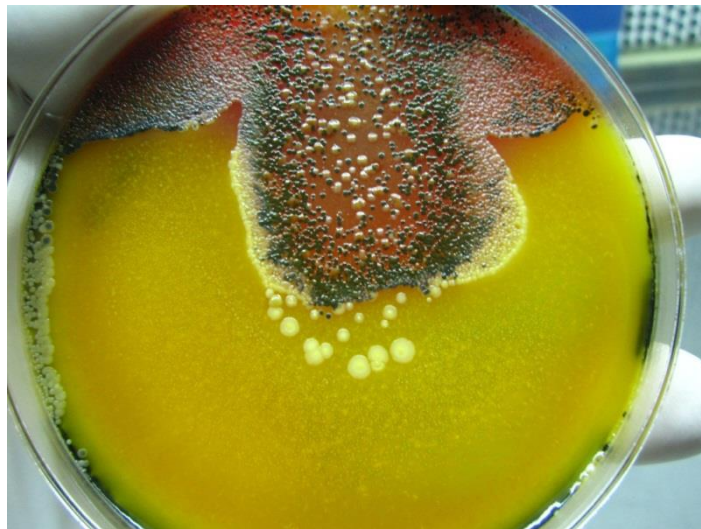


Figura 23: Fotografía del medio XLD con inculo de lombriz.

En la identificación de *Pseudomonas* se utilizó un medio específico el cual fue elaborado dentro de las instalaciones, de acuerdo a los ingredientes que esta conlleva, el medio se conoce comercialmente como King B. Este medio propicia la fluorescencia de la *Pseudomonas aeruginosa*, la cual al pasar por luz UV con una longitud de onda larga.

En este tipo de muestra existió crecimiento de flora microbiana en el medio, pero esta no produce fluorescencia. Se ha reportado que este géneros de *Pseudomonas* son capaces de producir ciertos tipos de sideróforos, como pseudomonina, quinolobactina, corrugativa, nocardamina y ácido piridina-2,6-ditiocarboxílico (Cornelis y Matthijs, 2002 citado por Luque, 2007; Budzikiewiez, 1997).

Esta razón puede explicar el por qué cepas como las que crecieron dentro de esta placa no presentaron fluorescencia.

Los sideróforos son uno de los mecanismos indirectos usados por las PGPRs para captar hierro, sin embargo estos solo se producen cuando los microorganismos se encuentran en condiciones hipoférricas.

Identificación microbiológica en la relación excreta (85%)-peat moss (15%).

En la identificación microbiológica de la relación de los sustratos para llevar a cabo la vermicomposta se utilizaron en relación de 85-15, la excreta de conejo y el peat moss, respectivamente.

En la vermicomposta se pueden encontrar microorganismos de una dimensión magnífica, mucho más que en la composta, ya que esta no alcanza la fase termofílica (Martínez 1996, Domínguez *et al.* 1997). En este caso donde los sustratos no han sido sometidos a un proceso de vermicompostaje, las posibilidades de encontrar microorganismos de nuestro interés son elevadas.

Identificación de *Escherichia coli* en la relación de sustratos.

Para la identificación de *Escherichia coli* en la relación de sustratos, se inocularon en 3 medios donde debido a las características de cada medio, se podría observar la presencia de dicha bacteria.

En el agar EMB se produjo un crecimiento exhaustivo, ya que se presentaron de manera uniforme y color negro azulado, sin presentar el brillo metálico aunque todo conejo es portador de *Escherichia coli* en su flora bacteriana digestiva, aunque en bajas concentraciones.

Una proliferación en tasas superiores a 10^6 determina el desarrollo del proceso. Un mal manejo, el estrés, una baja inmunidad, la inmadurez digestiva, las alteraciones

alimenticias, el síndrome respiratorio presente en las maternidades, y un largo etc. serán causas predisponentes. (Toni Roca (conejólogo2011)).

En el agar macConkey se produjeron colonias típicas de *E.coli* las cuales fueron rojas con halo turbio estas fueron debido a la rápida hidrólisis de la lactosa tal y como se muestra en la figura siguiente.

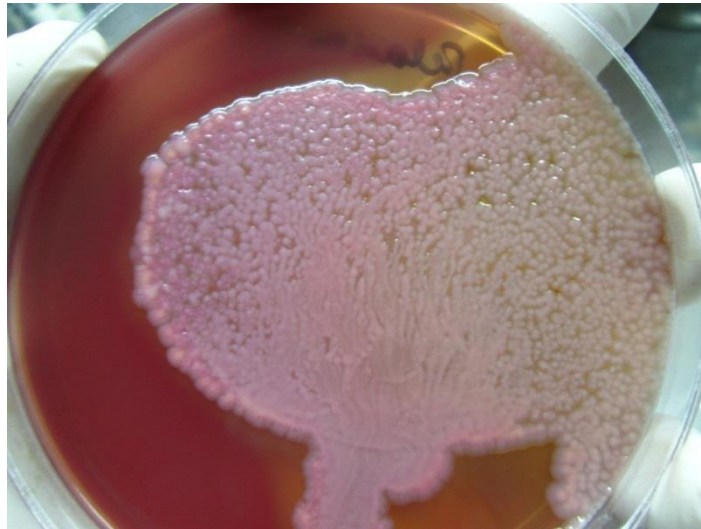


Figura 24: Fotografía de un cultivo típico de *Escherichia coli* en medio MacConkey.

Por su parte el medio ECD se observaron fluorescencia positiva, las cuales se detectó a las 24 horas de la inoculación, en una lámpara de luz UV con una longitud de onda de 366 nm.

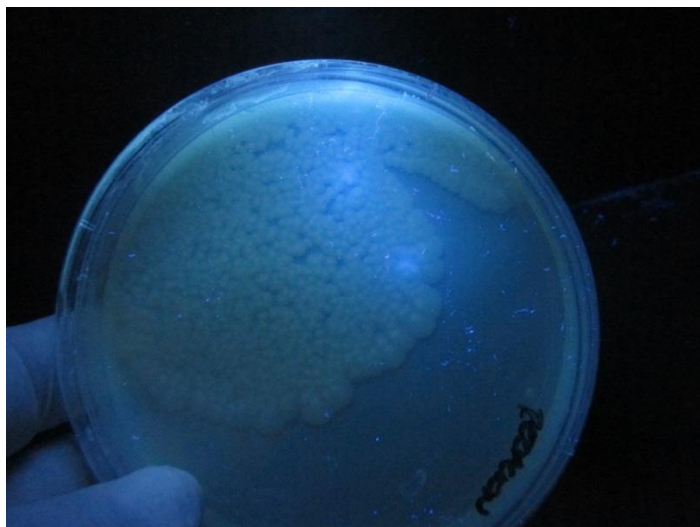


Figura 25: Fotografía tomada del inculo de la relación de sustratos a 24 horas de incubación.

La asociación de las lombrices de tierra con los microbios se encuentra a ser complejo. Aunque en esta parte no ha llegado, la presencia de *Escherichia coli* sigue siendo real debido a la imagen siguiente tal como lo describe (Edwards and Fletcher, 1988).

Identificación de *Salmonella* y *Shigella* en la relación de sustratos.

Se ha recomendado que *Salmonella* y *Escherichia coli* se ausente en el compost de residuos animales para su uso como biofertilizante (Schleiff and Dorn, 1997). Y este caso no es la excepción, por esto se realizó la identificación microbiológica, para esto se utilizó el "test *salmonella-shigella*" el cual consta de 3 agares.

Dentro de la identificación se encuentran la parte de agar SS el cual nos arrojó un resultado negativo ya que no se presentaron colonias características de *salmonella sp* o *shigella sp*, se observó que el crecimiento es de color rosado a rojo, colonias características de *E.coli*.

En el medio VB se observó el crecimiento detallado, el cual implica colonias rosas blancas sobre el fondo rojo, característico del medio. Existen ciertos patógenos tales como *salmonella* y *shigella* que no deben estar presentes por eso dependiendo que lombriz se utilizara en el proceso de vermicompostaje tendremos la noción de la reducción de coliformes tal y como menciona Monroy *et al* (2009); Edwards (2011); Airá *et al* (2011.).

Por su parte el agar XLD no se presentó crecimiento característico, a pesar de que todo el medio se tornó amarillo, por la hidrólisis de los azúcares, esto nos indica el crecimiento de otras bacterias.

Identificación de *Pseudomonas* en la relación de sustratos.

La identificación de *Pseudomonas* sp en la relación de sustratos se llevaron a cabo con medio King B, el cual es altamente selectivo para este tipo de microorganismo, debido a las propiedades de este medio propicia la fluorescencia de los metabolitos que producen esta bacteria.

Estos organismos son ubicuos y saprófitos y estos pueden explicar su alta prevalencia en este estudio. Tal como lo muestra la imagen que fue tomada dentro de la lámpara UV.

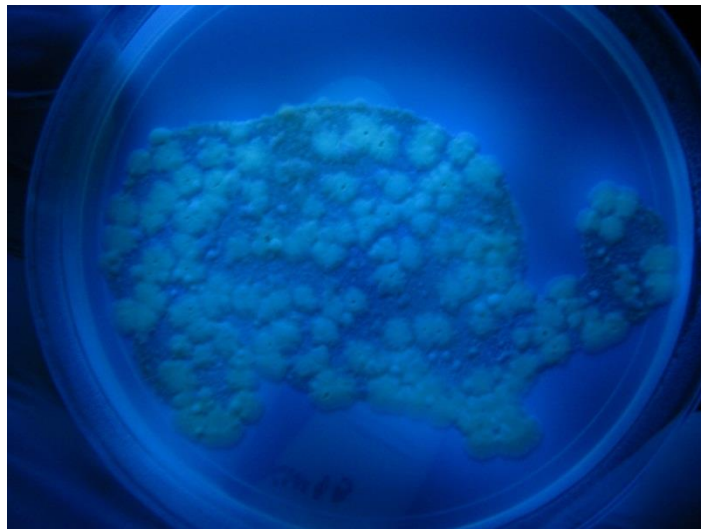


Figura 26: Fotografía tomada de cultivo de *Pseudomonas* presente en la Relación de los sustratos.

Conclusiones

El compost es el producto de proceso aeróbico durante el cual microorganismos juegan un papel importante. Esencialmente, los microorganismos que ayudan a descomponer la materia orgánica en un enmienda estable para mejorar la calidad y fertilidad del suelo (Borken *et al*, 2002. Tiquia, 2005).

Un número de biológico residuos pueden utilizarse para el compostaje que incluye residuos sólidos urbanos, animales y excrementos humanos, (Ryckeboer *et al*, 2003. Tiquia, 2005).

Los resultados de los análisis proximales, se realizaron con su debido análisis estadístico, en cuanto el análisis microbiológico se presentó resultados positivos, aunque se necesitan mucha investigación sobre las bacterias presentes dentro del organismo de las lombrices.

El compost de lombriz es un finamente dividido, la turba como material con alta porosidad, buena aireación, drenaje, retención de agua C, la actividad microbiana, estado excelente de nutrientes y buffering lo que resulta necesaria la caracteres fisicoquímicos agradables para la fertilidad del suelo.

El compost de lombriz mejora la biodiversidad del suelo por la promoción de los microbios beneficiosos que mejoran las características del suelo.

Debido a su innata biológica, bioquímica y fisicoquímico propiedades, humus de lombriz se puede utilizar para promover la agricultura sostenible y también para el seguro gestión de los residuos agrícolas, industriales, domésticos y hospitalarios que de otro modo podrían representar una amenaza grave para la vida y el medio ambiente.

Bibliografía

- Bollo E. 1999. Lombricultura: una alternativa de reciclaje. Quito. Soboc grafic. 149 p.
- Borken, W., Muhs, A., Reese, F. (2002). Changes in microbial and soil properties following compost treatment of degraded temperate forest soils. *soil biology biochemistry* 34, 403-412.
- Chacon A.G., Blanco J.M. (Eds.) 1999. manual práctico para la fabricación de abono orgánico utilizando lombrices. san José. costa rica. 39 p.
- Domínguez J., Edwards E., Subler S. 1997. a comparison of vermicomposting and composting. *biocycle* 38(4):57-59.
- Edwards Ca Burrows I, Fletcher Ke, Jones Ba (1984) the use of earthworms for composting farm wasted. en: gasser jkr (ed). composting of agricultural and other wastes. els. app. sci. publ. london. 241 pp.
- Ferruzi C. 1986. Manual de lombricultura. madrid. españa. mundi-prensa. 138 p.
- Fraile J., Obando R. 1994. Lombricultura: alternativa para el manejo racional de los desechos del banano. *aqua* 3(4):17-22.
- Gajalakshmi S, Abbasi S.A. 2008. Solid waste management by composting: state of the art. *critical reviews in environmental science and technology* 38:311–400 hashemimajd k, kalbasi m, golchin a, shariatmadari h (2004) comparison of vermicompost and compost as potting media for growth of tomatoes. *j. plant nutr.* 27: 1107-1123.
- Holoubek I. 2000. Polychlorinated biphenyls (pcb) world-wide contaminated sites. tocoen report no. 173
- Lopera Posada E., Aguirre Cardona J. 2006. Purification of mineral insulating oil contaminated with polychlorinated biphenyls (pcb's). *dyna*, 73: 75-88 luque, v. 2007. metabolismo del cianuro y del cianato en *pseudomonas pseudoalcaligenes* cect5344. aplicaciones biotecnológicas. capítulo iv, discusión. documento en línea:

[Http://Www.Economiaandaluza.Es/Archivos/Capitulos/Cap295.Pdf](http://www.economiaandaluza.es/archivos/capitulos/cap295.pdf). Fecha 21/11/09.

- Martínez C. 1996. Potencial de la lombricultura: elementos básicos para su desarrollo. a. carballo; s. bravo (eds). texcoco, mx. 140 p.
- Michel F.C. Jr, Quensen J., Reddy C.A. 2001. Bioremediation of a pcb—contaminated soil via composting. *compost science utilization* 9(4):274–283
- Monroy F, Aira M, Domínguez J (2009) Reduction of total coliform numbers during vermicomposting is caused by short-term direct effects of earthworms on microorganisms and depends on the dose of application of pig slurry. *sci tot environ* 407:5411–5416
- Rajiv K. Sinha, Sunita Agrawal, Krunal Chauhan, Vinod Chandran, Brijal Kiranbhai Soni. 2010. Vermiculture technology: reviving the dreams of sir charles darwin for scientific use of earthworms in sustainable development programs. *technology and investment*, 1: 155-172.
- Ramírez C. 1996. Efecto de las prácticas agrícolas sobre la microflora del suelo: oportunidades en la fitoprotección. x congreso nacional agronómico. universidad de costa rica. p. 81-83.
- Ruiz Aguilar G.M.L. 2005. Biodegradación de bifenilos policlorados (bpc's) por microorganismos. *acta universitaria*, 15: 19-28.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K. And Swing, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in monitored compost bin. *journal of applied microbiology* 94, 127-137.
- Soto, G., Y Muñoz, C. 2002. Consideraciones teóricas y prácticas sobre el compost y su empleo en la agricultura orgánica. *manejo integrado de plagas (costa rica)*. 65:123-129
- vasilyeva g. k., strijakova e.r. 2007. bioremediation of soils and sediments contaminated by polychlorinated biphenyls. *microbiology*, 76 (6): 639-653.
- Werner M., Cuevas J.R. 1996. Vermiculture in cuba. *biocycle* 37(6):57-59.

- Zachary A., Hickman Z.A., Reid B.J. 2008. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *environ international* 34:1072–081