Universidad Nacional de Ingeniería

Área del Conocimiento de Agricultura

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE *SERRATIA MARCESCENS* EN LA BIODEGRADACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS GRAMOXONE Y 2,4-D A ESCALA DE LABORATORIO

Trabajo Monográfico para optar al título de

Ingeniero Químico

Elaborado por:

Br. Jeferson Isaac Luquez Blanco
2020-0955U

Br. Janice Karen Romero Flores
2020-0980U

Tutor:

MSc. Juan Manuel Alonso Santos

30 de septiembre de 2025
Managua, Nicaragua

DEDICATORIA

A mis padres, Tito y Verónica por amarme y apoyarme incondicionalmente, así como por haberse sacrificado con la finalidad de que hoy obtenga este logro.

Jeferson Luquez

A Dios, por llenarme de sabiduría y fortaleza, por darme la satisfacción de cumplir una más de mis metas y por guiar cada paso en este camino.

A mi mamá, Esther Flores, por su dulce amor y apoyo incondicional. Su dedicación y esfuerzo constante para asegurar mi educación son un regalo invaluable. Este logro es tanto tuyo como mío.

Janice Romero

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero dar gracias a Dios por haberme cuidado durante los largos, cansados e incontables viajes desde mi querida casa hasta la capital, así como por la fuerza y sabiduría que me permitió afrontar toda la etapa universitaria.

A mis padres, Verónica y Tito por apoyarme desde un principio en el anhelo de ser ingeniero, por hacer enormes sacrificios y dejar de lado sus necesidades con la finalidad de brindarme la educación necesaria para obtener el título. También le agradezco al resto de mi familia, en especial a mis abuelos Julia y Gumercindo por brindarme su ayuda económica durante todo el proceso universitario.

A doña Lidia Orozco, por animarme, cuidarme y hacerme de comer como si de mi abuela se tratase; así como a Mabel Vásquez por brindarme un espacio en su casa, donde pasé innumerables horas haciendo tareas, descansando y riendo junto a la familia Vásquez Orozco.

A mi compañera de tesis Janice, por estar conmigo desde el inicio de esta etapa y haberme demostrado lo que significa una amistad real. Admiro su compromiso, dedicación y enfoque que mostró durante todo el desarrollo de esta investigación.

A nuestro tutor, MSc. Juan Alonso Santos por su acertada y sincera directriz durante todo el proceso de tesis.

Finalmente, quiero agradecer al Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA), por brindarnos el ingreso a sus instalaciones; así como al Lic. Elvis Conde, la Ing. Daniela López y Pedro Sirias por habernos apoyado en las etapas esenciales de este proyecto.

Jeferson Luquez

A Dios, por haberme sostenido con su amor y fortaleza a lo largo de este proceso. Por darme la vida, la salud y las oportunidades que me permitieron llegar hasta aquí.

A mis padres Esther y Manuel, por su amor, paciencia y por haber sembrado en mí el valor del esfuerzo y la educación, una herencia invaluable en mi formación profesional y personal.

A mi querida Mamá Minga y a mis tíos Ana, Jazmina, Johana y Luis, quienes no solo me brindaron su apoyo, sino también me abrieron las puertas de su hogar. Su compañía, comprensión y generosidad han sido una verdadera bendición. Agradezco a mis tíos Isidro y Darwin, por estar siempre dispuestos a ayudarme, así como a mi hermana Carrey, por haberme apoyado en el momento en que lo necesité. Gracias a todos por ser parte fundamental en este capítulo de mi vida.

A mi compañero de tesis, Jeferson, por su compromiso, colaboración y por brindarme su amistad sincera a lo largo de todos estos años universitarios.

A nuestro tutor, MSc. Juan Alonso Santos, por su orientación, dedicación y acompañamiento durante el desarrollo de esta investigación.

Finamente, al Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA), por facilitarnos el acceso a sus instalaciones y al acompañamiento de su personal durante el desarrollo de este proyecto.

Janice Romero

Opinión del Catedrático Guía

En Nicaragua, la agricultura representa un pilar fundamental de la economía; sin embargo, su dependencia del uso extendido de plaguicidas como Gramoxone y 2,4-D genera una creciente preocupación por la contaminación del suelo y las fuentes de agua. Los efectos adversos de estos agroquímicos en los ecosistemas y la salud pública hacen imperativo el desarrollo de estrategias de remediación que sean efectivas, seguras y sostenibles.

Frente a este desafío, la biorremediación microbiana emerge como una alternativa prometedora. El presente trabajo de investigación se adentra en esta área, explorando una solución innovadora y de gran relevancia para el contexto nacional. La investigación evalúa el potencial de una cepa de *Serratia marcescens*, aislada de una fuente local en Chontales, para biodegradar dos de los plaguicidas de mayor uso en el país.

Los bachilleres Jeferson Isaac Luquez Blanco y Janice Karen Romero Flores han desarrollado un estudio de laboratorio riguroso y metódico. Iniciaron con la activación y caracterización morfológica de la cepa bacteriana, para luego construir curvas de calibración que permitieron monitorear con precisión tanto el crecimiento microbiano como la concentración de los plaguicidas mediante espectrofotometría UV/Vis. Posteriormente, analizaron la cinética de crecimiento de la bacteria, demostrando su capacidad para utilizar estos compuestos como única fuente de carbono.

Los resultados obtenidos son notables y confirman la hipótesis central del estudio. Se demostró que *Serratia marcescens* no solo tolera la presencia de Gramoxone y 2,4-D, sino que es capaz de degradarlos de manera significativa en un período de 24 horas, alcanzando una eficiencia de hasta el 31.80% para 2,4-D y 23.82% para Gramoxone. Estos hallazgos posicionan a esta cepa bacteriana como una candidata viable para el desarrollo de futuras tecnologías de biorremediación aplicadas a entornos contaminados.

El trabajo refleja una excelente aplicación de los conocimientos en biotecnología e ingeniería química, así como una notable iniciativa y dedicación por parte de los tesistas. Han abordado un problema ambiental relevante con seriedad científica y han generado conocimiento valioso y pertinente para nuestro país.

Por todo lo expuesto, considero que esta investigación cumple con creces los estándares de calidad y rigor académico exigidos por nuestra institución. Solicito a los honorables miembros del jurado calificador que otorguen la máxima calificación a este proyecto y concedan a los bachilleres Jeferson Isaac Luquez Blanco y Janice Karen Romero Flores el título de Ingenieros Químicos.

Atentamente,

MSc. Juan Manuel Alonso Santos
Tutor

RESUMEN

Debido al impacto negativo que los plaguicidas tienen sobre el medio ambiente, existe una búsqueda constante para encontrar maneras de reducir los efectos causados por estos compuestos. Los microorganismos tienen una versatilidad bioquímica considerable, que utilizan para adaptarse y desarrollarse en diferentes entornos. Esta característica y otras hacen de los microorganismos una herramienta adecuada para la remediación tanto del suelo como del agua. En este contexto, se desarrolló el presente estudio con el objetivo de evaluar el potencial de biodegradación de una cepa de *Serratia marcescens*, aislada de leche fresca proveniente de La Libertad, Chontales, frente a los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone, a escala de laboratorio.

La investigación se estructuró en cuatro etapas: activación e identificación de la cepa bacteriana mediante tinción de Gram; cuantificación de células viables a través de diluciones seriadas y construcción de una curva de calibración (UFC/mL vs absorbancia); análisis de la cinética de crecimiento en presencia de los plaguicidas como única fuente de carbono; y evaluación de la eficiencia de biodegradación mediante espectrofotometría UV/Vis. Las curvas de calibración se realizaron midiendo la absorbancia a 600 nm para estimar la biomasa bacteriana, y a 229 nm y 258 nm para los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone, respectivamente, correspondientes a sus picos máximos de absorción en el espectro UV/Vis.

Los resultados experimentales demostraron que *Serratia marcescens* fue capaz de desarrollarse en medios con concentraciones variables de ambos plaguicidas, lo que evidenció su capacidad para asimilarlos como fuente de carbono. El análisis de biodegradación indicó una mayor eficiencia frente al 2,4-D, con una reducción máxima del 31.80% en su concentración inicial, mientras que para Gramoxone se alcanzó una degradación de hasta el 23.82%.

Concluido este estudio, se confirma que la cepa evaluada de *Serratia marcescens* representa una alternativa para el desarrollo de estrategias de biorremediación para mitigar los impactos de la contaminación causada por el uso de agroquímicos.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN 1
II OBJETIVOS 3
2.1 Objetivo General 3
2.2 Objetivos Específicos 3
III MARCO TEÓRICO 4
3.1 Plaguicidas 4
3.1.1 Usos de los plaguicidas 4
3.1.2 Composición de los plaguicidas 5
3.2 Plaguicidas en Nicaragua 5
3.2.1 2,4-D 6
3.2.2 Gramoxone 8
3.3 Contaminación ambiental por plaguicidas 11
3.3.1 Agua 11
3.3.2 Suelo 12
3.3.3 Aire 12
3.4 Alternativas para la eliminación de plaguicidas en el medio ambiente 13
3.4.1 Oxidación 13
3.4.2 Tratamientos físicos 13
3.4.3 Tratamientos biológicos 13
3.5 *Serratia marcescens* 14
3.5.1 Taxonomía de *Serratia marcescens* 15
3.5.2 Medios de cultivo para bacteria *Serratia marcescens* 15
3.6 Técnicas de sembrado 16
3.6.1 Siembra por estría en placa 16
3.6.2 Siembra para aislamiento o recuento 17
3.7 Identificación microbiana 18
3.7.1 Tinción de Gram 18
3.8 Cinética de crecimiento 20
3.9 Curva de calibración (UFC/mL vs Absorbancia) 21
3.10 Espectrofotometría UV/Vis 21
IV HIPÓTESIS 23
V METODOLOGÍA 24

5.1 Ámbito de estudio 24
5.2 Reactivación de la cepa bacteriana..... 24
5.2.1 Preparación del medio de cultivo sólido 24
5.2.2 Siembra por agotamiento en estrías..... 25
5.2.3 Comprobación de la pureza bacteriana 26
5.3 Espectro UV/Vis plaguicidas 2,4-D y Gramoxone 26
5.4 Curva de calibración plaguicidas 2,4-D y Gramoxone (Concentración (%) vs Absorbancia) 27
5.5 Curva de calibración bacteriana (UFC/mL vs Absorbancia)..... 27
5.5.1 Preparación del medio líquido mineral..... 27
5.5.2 Siembra en medio líquido 28
5.5.3 Diluciones seriadas..... 28
5.5.4 Recuento en placas 29
5.5.5 Medición de absorbancia..... 29
5.6 Evaluación de biodegradación *Serratia marcescens* en presencia de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D como fuentes de carbono..... 29
5.6.1 Preparación de preinóculos 29
5.6.2 Preparación de inóculos 31
5.7 Diseño experimental..... 32
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN 34
6.1 Reactivación de la cepa bacteriana..... 34
6.2 Comprobación de la pureza bacteriana..... 35
6.3 Espectro UV/Vis Gramoxone y 2,4-D 35
6.4 Curva de calibración plaguicidas 2,4-D y Gramoxone (Concentración (%) vs Absorbancia) 37
6.5 Curva de calibración bacteriana en caldo LB (Absorbancia vs UFC/mL) . 39
6.6 Evaluación del crecimiento de *Serratia marcescens* en presencia de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone como fuentes de carbono..... 40
6.7 Cuantificación de la biodegradación de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D por *Serratia marcescens* 46
VII CONCLUSIONES 50
VIII RECOMENDACIONES..... 51
IX BIBLIOGRAFÍA..... 52
X ANEXOS..... 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de la bacteria Serratia marcescens 15

Tabla 2 Descripción de las hipótesis planteadas para el estudio 23

Tabla 3 Contenido de matraces Erlenmeyer en la preparación de los inóculos 31

Tabla 4 Niveles y tratamientos considerados para evaluar la biodegradación de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone por la bacteria Serratia marcescens 33

Tabla 5 Absorbancia y UFC/mL de Serratia marcescens en presencia de Gramoxone y 2,4-D 41

Tabla 6 Absorbancia, concentración de plaguicida y % de biodegradación de Serratia marcescens en presencia de Gramoxone 46

Tabla 7 Absorbancia, concentración de plaguicida y % de biodegradación de Serratia marcescens por efecto de 2,4-D 47

Tabla 8 Espectro UV/Vis de Gramoxone (20 mg/L) en términos de longitud de onda (nm) y absorbancia..... 58

Tabla 9 Espectro UV/Vis de 2,4-D (20 mg/L) en términos de longitud de onda (nm) y absorbancia 59

Tabla 10 Valores de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de Gramoxone (258 nm, 10 mg/L) 60

Tabla 11 Valores de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de 2,4-D (229 nm, 10 mg/L) 60

Tabla 12 Valores de UFC/mL y absorbancia para la construcción de la curva de calibración bacteriana 62

Tabla 13 Parámetros logísticos del testigo y los tratamientos..... 63

Tabla 14 Resumen de los valores de suma, promedio y varianza de la primera hipótesis 63

Tabla 15 Análisis de varianza de la primer hipótesis..... 64

Tabla 16 Resumen de los valores de suma, promedio y varianza de la segunda hipótesis 64

Tabla 17 Análisis de varianza de la segunda hipótesis 64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Uso de plaguicidas 2016-2021 4
Figura 2 Estructura química de 2,4-D 6
Figura 3 Degradación metabólica de 2,4-D 7
Figura 4 Espectro UV/Vis del 2,4-D 8
Figura 5 Estructura química del Gramoxone 9
Figura 6 Degradación microbiana del Gramoxone 10
Figura 7 Espectro UV/Vis del Gramoxone 11
Figura 8 Serratia marcescens luego de 48 horas de incubación a 30 °C 14
Figura 9 Técnica de siembra por estría 17
Figura 10 Técnica de diluciones sucesivas 18
Figura 11 Esquema general de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas 19
Figura 12 Reactivos utilizados en la tinción de Gram 19
Figura 13 Curva de crecimiento bacteriano 20
Figura 14 Preparación del medio Agar MacConkey. (A) Medio de cultivo en su envase. (B) Disolución del medio de cultivo en la plancha calefactora con agitación. (C) Placa petri con el medio de cultivo solidificado 25
Figura 15 Siembra de Serratia marcescens con la técnica por agotamiento en estrías 25
Figura 16 Proceso de tinción de Gram. (A) Toma de muestra del microrganismo. (B) Preparación del frotis. (C) Frotis teñido para observación microscópica 26
Figura 17 Diluciones seriadas para el recuento en placa 28
Figura 18 Preparación de preinóculos 30
Figura 19 Agitación de preinóculos a 200 rpm y 30 °C 30
Figura 20 Preparación de inóculos 31
Figura 21 Crecimiento de Serratia marcescens tras 24 horas de incubación en medio Agar MacConkey. (A) Observación en placa. (B) Visualización en un contador de colonias 34
Figura 22 Observación de Serratia marcescens bajo el microscopio 35
Figura 23 Espectro UV/Vis de Gramoxone (20 mg/L) 36
Figura 24 Espectro UV/Vis de 2,4-D (20 mg/L) 36
Figura 25 Curva de calibración Gramoxone (258 nm, 10 mg/L) 38
Figura 26 Curva de calibración 2,4-D (229 nm/ 10 mg/L) 38
Figura 27 Curva de calibración bacteriana Serratia marcescens 40

Figura 28 Relación entre la absorbancia y tiempo (h) a 600 nm 41

Figura 29 Curva de crecimiento de S. marcescens (testigo) 42

Figura 30 Curva de crecimiento de S. marcescens en presencia de Gramoxone (20 mg/L) 43

Figura 31 Curva de crecimiento de S. marcescens en presencia Gramoxone (10 mg/L) 43

Figura 32 Curva de crecimiento de S. marcescens en presencia de 2,4-D (20 mg/L) 44

Figura 33 Curva de crecimiento de S. marcescens en presencia de 2,4-D (10 mg/L) 45

Figura 34 Reducción de absorbancia en función del tiempo para las muestras con Gramoxone y 2,4-D 48

Figura 35 Porcentaje de biodegradación de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D en función del tiempo 48

Figura 36 Autoclave YAMATO SQ810C utilizada durante el desarrollo del trabajo monográfico para la preparación de medios de cultivo y la esterilización de cristalería 56

Figura 37 Incubadora microbiológica Thermo Scientific Heratherm utilizada para el cultivo de Serratia marcescens 56

Figura 38 Microscopio Olympus BH-2 utilizado para la identificación morfológica del microorganismo mediante la tinción de Gram 57

Figura 39 Espectrofotómetro Hatch DR 6000 utilizado para el escaneo del espectro UV/Vis y posterior medición de absorbancia 57

Figura 40 Conteo de colonias de la bacteria Serratia marcescens (dilución 10^{-5}). 60

Figura 41 Morfología bacteriana 62

I INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (2002), define a un plaguicida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas y productos de madera.

A medida que la población aumenta, también lo hace la producción de cultivos; la necesidad de maximizar la producción de estos cultivos para satisfacer las necesidades de la población probablemente seguirá siendo la implementación de plaguicidas, que a pesar de su efectividad en el control de plagas, existen evidencias de que, del total de plaguicidas utilizados en la agricultura, solamente el 1% del principio activo se utiliza para controlar las plagas; el resto de ellos tiende a depositarse en suelos distribuyéndose o filtrándose a través de el hacia aguas subterráneas o directamente hacia cuerpos de agua como ríos y arroyos (Cruz y otros, 2014).

Los daños que se causan al ambiente y a la salud, hacen necesario el desarrollo de estrategias para la remediación de sitios contaminados. Existe una gran variedad de métodos físicos y químicos para tratar los suelos y mantos acuíferos contaminados, pero muchos de estos tratamientos no destruyen los compuestos peligrosos, sino que los transfieren de una fase a otra, por lo que el tratamiento biológico en el que se transforman estos compuestos peligrosos en compuestos más simples sigue siendo un desafío importante en la actualidad (Mendoza y otros, 2011).

En las últimas décadas, el interés por las técnicas biológicas de descontaminación ha crecido significativamente debido a su simplicidad, mayor eficiencia y menor costo en comparación con otros métodos. El uso de microorganismos para la biodegradación de plaguicidas se ha consolidado como una tecnología emergente y competitiva, con la capacidad de descomponer estos contaminantes en diferentes ecosistemas de forma eficaz.

Investigaciones realizadas por Mendoza y otros (2011) de la Universidad Autónoma de Puebla, demostraron que cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* lograron degradar hasta un 95% de permetrina y un 90% de cipermetrina en un período de 15 días. De manera similar, Gómez y otros (2018), del Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, Veracruz, identificaron una cepa de *Serratia marcescens* en suelos agrícolas con un historial prolongado de uso de 2,4-D, evidenciando su capacidad para degradar este compuesto y su potencial aplicación en la biorremediación de suelos y cuerpos de agua contaminados.

Esta investigación tiene como objetivo principal evaluar el potencial de biodegradación de la bacteria *Serratia marcescens*, preservada en el Laboratorio de Biotecnología de la UNI-PIENSA, frente a los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D. La cepa que se utilizó fue aislada de una muestra de leche fresca en La Libertad, Chontales, en octubre de 2019 y se mantiene preservada en placas Petri con agar

nutritivo a una temperatura controlada de 4 °C, con activaciones cada tres meses. Para cumplir con el objetivo**,** se analizó su comportamiento en distintas concentraciones de estos compuestos, estudiando la cinética de crecimiento de la bacteria y utilizando técnicas de espectrofotometría UV/Vis para determinar la eficiencia del proceso de biodegradación.

En Nicaragua, la investigación sobre la biodegradación de plaguicidas mediante bacterias es aún limitada, lo que resalta la relevancia de este estudio. *Serratia marcescens* ha demostrado ser una opción viable para descomponer compuestos orgánicos complejos, por lo que evaluar su capacidad para degradar el Gramoxone y el 2,4-D puede aportar información valiosa para futuras estrategias de biorremediación. Además, los resultados de este estudio podrían contribuir al desarrollo de soluciones enfocadas en reducir la contaminación por plaguicidas en el país, promoviendo prácticas agrícolas más responsables y sostenibles.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Evaluar el potencial de *Serratia marcescens* en la biodegradación de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone a escala de laboratorio.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar morfológicamente la cepa *Serratia marcescens* mediante tinción de Gram.
- Determinar la concentración de células viables de *Serratia marcescens* en medio líquido mineral (MLM) mediante la construcción de una curva de calibración, diluciones seriadas y recuento en placa.
- Analizar la cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* a diferentes concentraciones de 2,4-D y Gramoxone, mediante curvas de crecimiento que representen el Tiempo vs las UFC/mL.
- Cuantificar la eficiencia de biodegradación de 2,4-D y Gramoxone en presencia de *Serratia marcescens* utilizando espectrofotometría UV/Vis.

III MARCO TEÓRICO

Este capítulo tiene como objetivo ofrecer una descripción detallada de la bacteria *Serratia marcescens*, los plaguicidas en estudio y las alternativas existentes para su degradación y eliminación.

3.1 Plaguicidas

Según Sánchez y Sánchez (1984), citados por Castillo y otros (2020), consideran que los plaguicidas son compuestos químicos que se emplea para aplicar y controlar a los parásitos y enfermedades que atacan a los diferentes cultivos, los que se clasifican según su actividad biológica en: insecticidas, herbicidas, fungicidas, y rodenticidas; esta a su vez se clasifica según su toxicidad. Sin embargo, también consideran que existen atrayentes, repelentes, y esterilizantes de insectos, controlando o destruyendo por acción de estos productos.

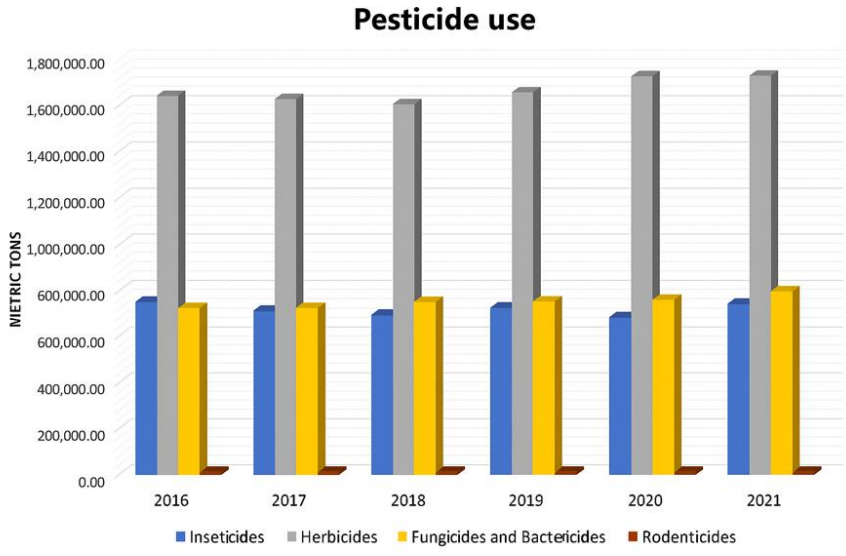
3.1.1 Usos de los plaguicidas

Utilizar plaguicidas en la agricultura resulta ser más rápido, flexible y fácil de usar; su amplio espectro permite actuar en forma simultánea en varias plagas; controlar patógenos y vectores que ocasionan daños a los cultivos; menor gasto energético y tiempo de trabajo por los agricultores del campo; mayor rendimiento y mejor calidad de los productos obtenidos; lo cual disminuye los trabajos en exceso en el campo; logrando una mayor producción agrícola y haciendo que la misma sea mucho más rentable (Castillo y otros, 2020).

El uso de plaguicidas ha ido en aumento en las últimas décadas. Entre 2016 y 2021, el uso de diferentes plaguicidas experimentó un crecimiento constante (Figura 1); la tendencia de aumento se presenta en toneladas anuales.

Figura 1

Uso de plaguicidas 2016-2021



Fuente: Guerrero y otros, 2023

Los pesticidas se han utilizado en la agricultura durante al menos 80 años, y el primer pesticida creado fue el diclorodifeniltricloroetano (DDT). Veinte años después de su descubrimiento, se prohibió su uso en la agricultura. Desde el descubrimiento del DDT, se han comercializado otros tipos de pesticidas, la mayoría de los cuales afirman ser seguros. Sin embargo, aún existe preocupación pública sobre los riesgos para la salud que puede presentar el uso de pesticidas (Guerrero, y otros, 2023).

3.1.2 Composición de los plaguicidas

De acuerdo con Lezaun (2023), formular un pesticida consiste en preparar sus componentes activos en la concentración adecuada con el agregado de sustancias auxiliares. La formulación está formada por un ingrediente activo (IA) más otros ingredientes inertes o sustancias auxiliares.

El ingrediente o principio activo (IA) es el producto que mata o controla la peste y los ingredientes inertes son sustancias que acompañan al ingrediente activo.

El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2014), menciona que los ingredientes inertes pueden clasificarse en:

- Solventes: puede ser agua, algún solvente derivado del petróleo o, más raramente, de otro tipo.
- Humectantes: a fin de permitir su dilución en agua.
- Espesantes.
- Tensioactivos: permiten un mejor contacto de la gota pulverizada con el objetivo.
- Adherentes.
- Agentes de aviso: Colorantes, sustancial de olor, etc.

3.2 Plaguicidas en Nicaragua

Nicaragua ha basado su economía en una estructura de agroexportación principalmente de materias primas. Desde el auge algodonero experimentado en décadas pasadas hasta la actualidad, en el país ha persistido una cultura de aplicación de grandes cantidades de plaguicidas con diferentes niveles de toxicidad y persistencia. Con una economía dependiente de la agricultura, al país se han introducido grandes cantidades de diversos tipos de plaguicidas con diferentes niveles de toxicidad y persistencia como alternativa para el control de plagas (Cuadra y Vammen, 2010).

Ebanks y otros (2015), menciona que actualmente, en la Región Autónoma del Atlántico Sur de Nicaragua, los plaguicidas más utilizados son el gramoxone un 41%; glifosato, cipermetrina y 2,4-D con un 17% cada uno; otros de menor frecuencia de uso en un 8%. Mientras que Domínguez (2020) logró identificar la presencia de otros plaguicidas en hortalizas, destacándose: clorpirifos, mocap, clorotalonil, imazalil, diazinon, deltametrina y simazina, en concentraciones entre 0.005 mg/kg hasta 5.3 mg/kg; esto puede sugerir su mayor utilización en los cultivos agrícolas.

Considerando lo anteriormente mencionado por Ebanks y otros (2015), los siguientes acápites se centrarán en los plaguicidas considerados de mayor importancia para los autores.

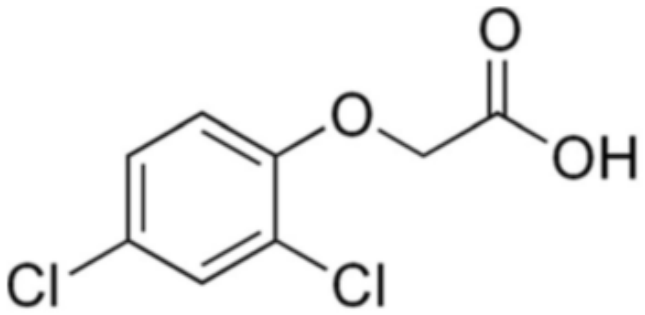
3.2.1 2,4-D

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida sistémico común que se utiliza para controlar las malezas de hoja ancha. Es el herbicida más utilizado en el mundo y el tercero más utilizado en América del Norte. El 2,4-D también es una auxina sintética importante que pertenece a una clase de reguladores del crecimiento de las plantas y se utiliza a menudo en laboratorios para la investigación de plantas y como complemento en medios de cultivo de células vegetales (Montana Goverment, 2023).

En la Figura 2 se muestra la estructura química de 2,4-D.

Figura 2

Estructura química de 2,4-D



Fuente: Magnoli y otros, 2020

Con respecto al mecanismo de acción del 2,4-D se absorbe a través de las hojas y se traslada a los meristemos de la planta. El crecimiento descontrolado e insostenible provoca el enrollamiento del tallo, el marchitamiento de las hojas y, finalmente, la muerte de la planta. El 2,4-D se aplica normalmente como sal de amina, pero también existen versiones de éster más potentes (Montana Goverment, 2023).

De acuerdo a Montana Goverment (2023), el 2,4-D se utiliza más comúnmente para:

- Control de malezas en césped
- Control de malezas y matorrales a lo largo de cercas paso de carreteras y ferrocarriles
- Liberación de coníferas (control de árboles de hoja ancha en plantaciones de coníferas)
- Pastos y campos de heno con hierba
- Granos de cereales

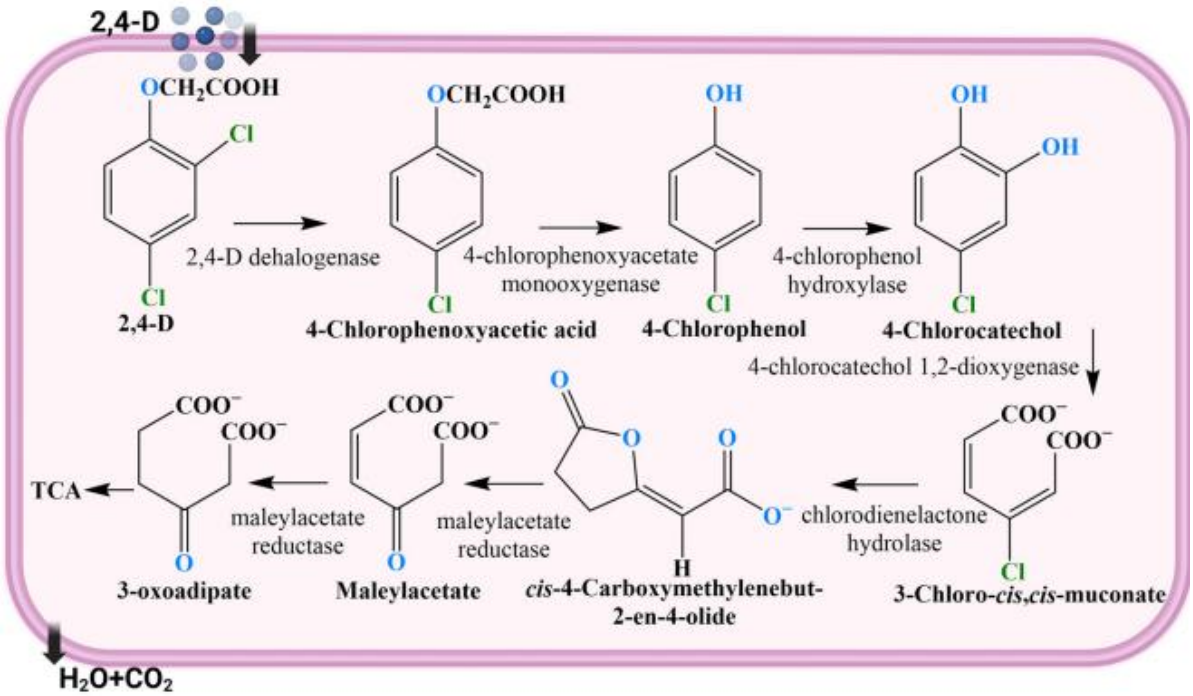
- Maíz y sorgo
- Como análogo sintético de auxina

En la Figura 3, se muestra la ruta metabólica degradativa propuesta por Chen y otros. (2024) para el 2,4-D. Primeramente, la deshalogenación reductora en el cloro de la posición 2 ocurre antes de la eliminación del grupo acetiloxi. Por lo general, implica la descloración reductora del 2,4-D por una enzima deshalogenasa, lo que conduce a la generación de ácido 4-clorofenoxiacético, que luego se transforma en 4-clorofenol por la acción de la 4-clorofenoxiacetato monooxigenasa.

Después de esto, el 4-clorofenol es hidroxilado por la 4-clorofenol hidroxilasa en 4-clorocatecol, que posteriormente se convierte en 3-cloro-cis,cis-muconato y cis-4-carboximetilenobut-2-en-4-olida como resultado de las reacciones enzimáticas que involucran a la 4-clorocatecol 1,2-dioxigenasa y la clorodienelactona hidrolasa. Al final, el acetato de maleilo reductasa cataliza la conversión gradual de este intermediario primero en acetato de maleilo y posteriormente en 3-oxoadipato, que luego se convierte en parte del ciclo del TCA (Ácido tricarboxílico).

Figura 3

Degradación metabólica de 2,4-D



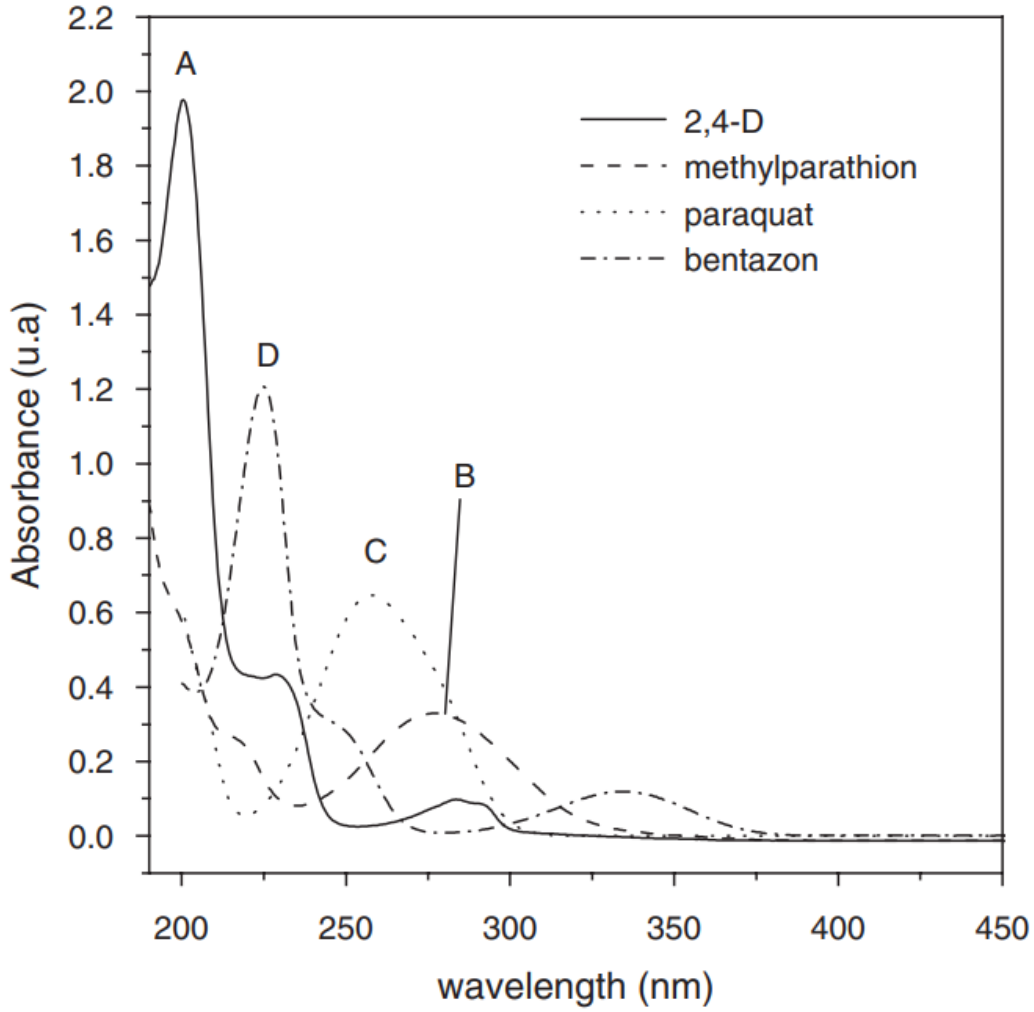
Fuente: Chen y otros, 2024

Es importante reconocer que ciertas colonias bacterianas aisladas pueden carecer del conjunto completo de enzimas necesarias para la mineralización total de 2,4-D, y posiblemente solo posean aquellas que se dirigen al compuesto primario. Como resultado, un consorcio de microorganismos puede lograr una descomposición más eficiente y completa del herbicida (Chen y otros, 2024).

El espectro UV-Vis del plaguicida 2,4-D se muestra en la Figura 4. Como se puede observar, 2,4-D presenta una intensidad de absorbancia y longitud de onda principalmente a 200 nm, que puede usarse para la cuantificación de cada pesticida en los estudios de sorción de pesticidas y polímeros (Capparelli y otros, 2006).

Figura 4

Espectro UV/Vis del 2,4-D



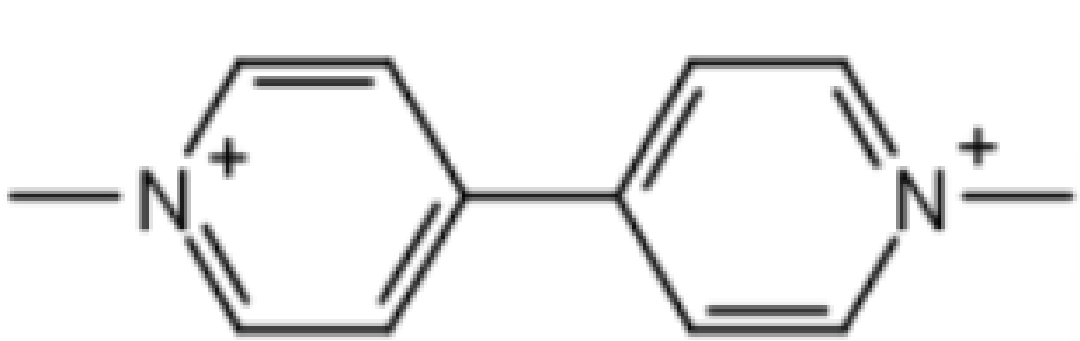
Fuente: Capparelli y otros, 2006

3.2.2 Gramoxone

El paraquat con nombre químico dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo, conocido con el nombre comercial de Gramoxone, es un principio activo del grupo de los bipiridilos. En la Figura 5 se muestra su estructura química (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina, 2021).

Figura 5

Estructura química del Gramoxone



Fuente: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina, 2021

El Gramoxone es usado como un herbicida de amonio cuaternario no selectivo de amplio espectro que actúa por contacto, es decir, no se trasloca sino que afecta al órgano verde cuya superficie resulta asperjada. Se lo emplea como herbicida de amplio espectro para controlar malezas o bien como desecante/defoliante de cultivos (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina, 2021).

De acuerdo al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina (2021) su acción herbicida es por contacto. Luego de entrar en contacto con las plantas, su movilidad es de escasa a nula y destruye los tejidos del follaje (hojas y tallos no lignificados) en el sitio donde impacta la gota del asperjado. El mecanismo de acción de este herbicida, que sólo progresa en las partes de la planta con las que entra en contacto si estas realizan fotosíntesis, culmina con el colapso de la estructura celular y su desecación.

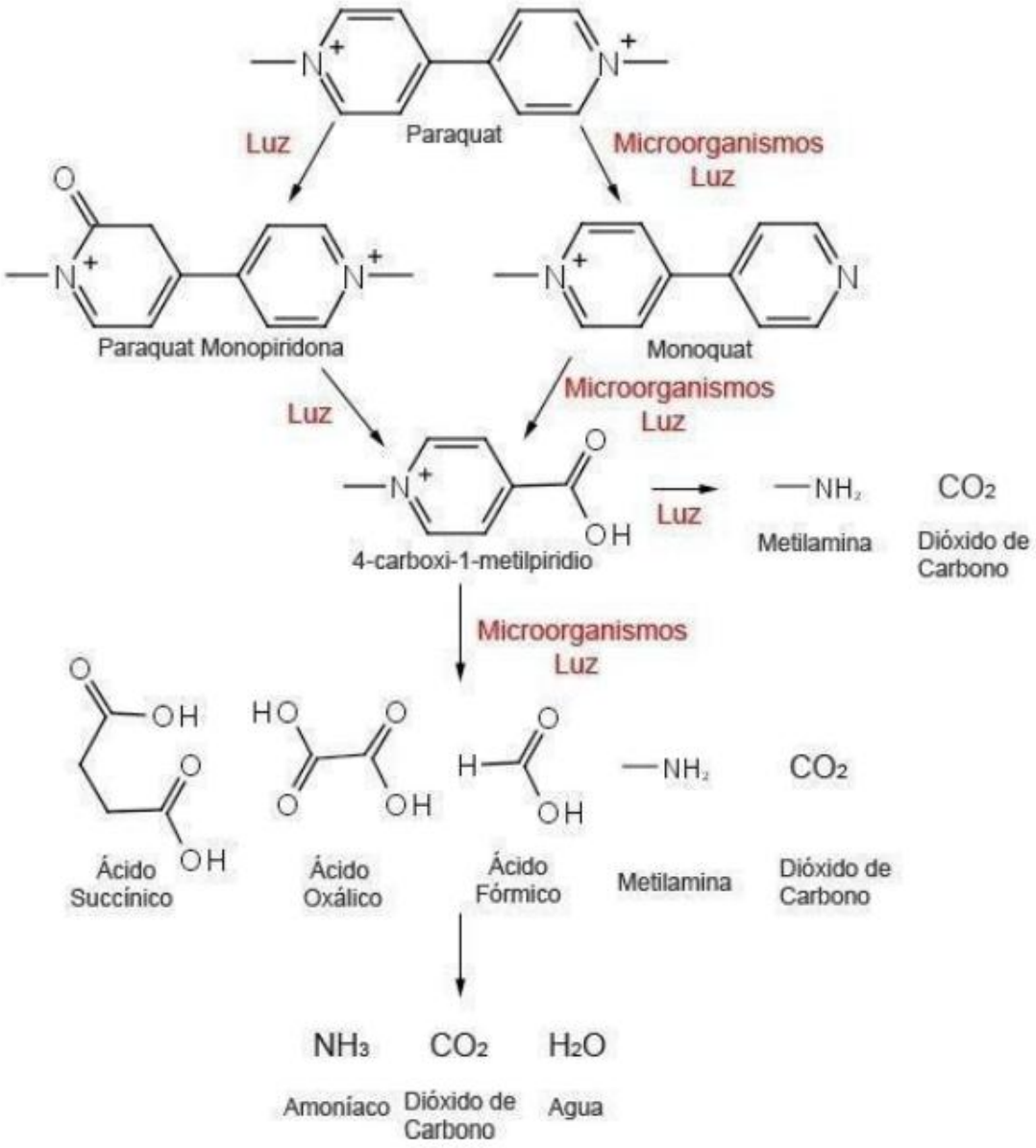
Con respecto al uso en los cultivos, Syngenta (2021) menciona que el gramoxone se utiliza en:

- Frutales pomáceos (manzano, peral, membrillero)
- Frutales cítricos (limón, mandarina, naranja)
- Cultivos de siembre directa (avena, trigo, cebada, frijol, maíz, sorgo, soya, cebolla, lechuga, melón, pepino, sandía, tomate, zanahoria)

El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina (2021) menciona que en la degradación microbiana de Gramoxone, los principales productos intermediarios son el 4-carboxi-1-metilpiridio y metilamina; esto se puede observar en la Figura 6.

Figura 6

Degradación microbiana del Gramoxone



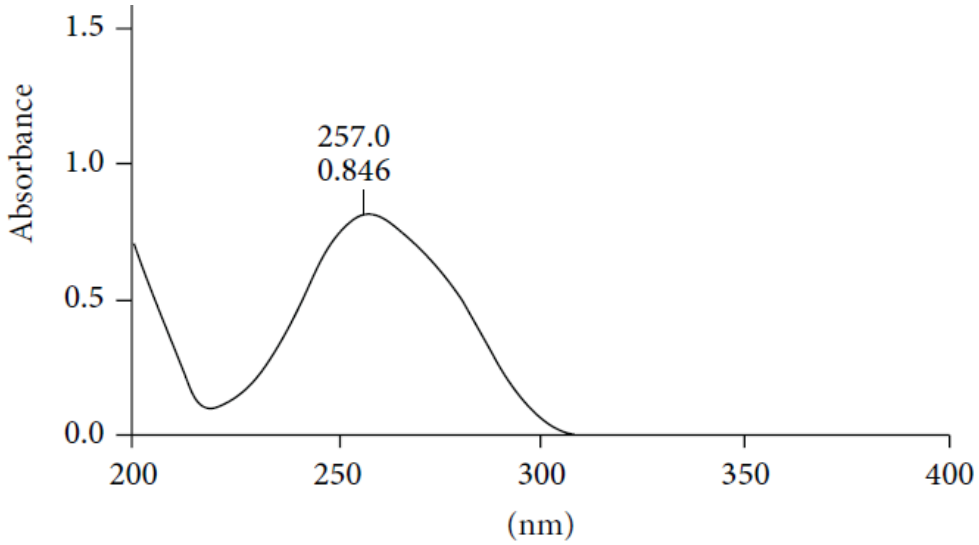
Fuente: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina, 2021

No se ha demostrado metabolismo de paraquat en animales debido a que no se absorbe bien cuando se administra por vía oral. En experimentos con ratas se vio que más de la mitad de una dosis oral (≥70%) se elimina en las heces, y una pequeña proporción (10-20%) se absorbe y luego se elimina sin transformación en orina.

En la Figura 7, se muestra el espectro UV de una solución acuosa de Gramoxone 10 µg/mL realizado por Aghaii y Shetab (2014).

Figura 7

Espectro UV/Vis del Gramoxone



Fuente: Aghaii y Shetab, 2014

3.3 Contaminación ambiental por plaguicidas

Actualmente, los peligros que acarrea el uso inadecuado de agroquímicos sintéticos comprometen la sostenibilidad de la agricultura moderna; en este contexto, los países en desarrollo son los más afectados debido a que el incremento de la producción agrícola va acompañado de un acelerado deterioro de los recursos naturales y de la salud pública. Los países en desarrollo utilizan el 25 % de los plaguicidas que se producen en el mundo y padecen el 99 % de las muertes a causa de intoxicaciones agudas por plaguicidas (Benítez y Contreras, 2013).

3.3.1 Agua

De acuerdo a Benítez y Contreras (2013), la contaminación del agua es una de las formas de exposición crónica a bajas dosis de plaguicidas a las cuales está sometido el ser humano, así como la fauna acuática y terrestre.

En general, la agricultura intensiva combinada con escurrimientos superficiales, lixivia y envía el agua de lluvia a los canales de drenaje, provocando un incremento de los niveles de nutrientes y plaguicidas en los ríos (Ebanks y otros, 2015).

Según Ebanks y otros (2015), el aporte medio de plaguicidas a los cuerpos de agua varía considerablemente entre regiones y depende altamente de las tasas de aplicación, características químicas de los plaguicidas y las condiciones naturales durante su aplicación. La movilidad de los plaguicidas en el suelo y desde ahí su biodisponibilidad y transferencia a otro compartimiento ambiental, depende de una variedad de complejos procesos de dinámica física, química y biológica, incluyendo absorción-desabsorción, volatilización, degradación química y biológica, absorción por plantas, escurrimiento y lixiviación. La concentración de pesticidas tiende a ser mayor en pequeñas cuencas con intensa agricultura y cuando se usa equipo de aspersión defectuosos.

3.3.2 Suelo

Castillo y otros (2020) consideran que la presencia de plaguicidas en los suelos es ocasionada por diversas formas; como la aplicación aérea a las plantas para controlar plagas, con insecticidas, fungicidas y herbicidas que son los más usados, lo que ocasiona un almacenamiento del 50% del producto en el suelo. Sin embargo, la aplicación de herbicidas por su direccionalidad a combatir las malas hierbas va directo al suelo durante la preemergencia (antes que emerjan las plántulas) y presiembra. Por tanto, los plaguicidas incorporados al suelo ingresan en un ecosistema dinámico y empieza su degradación en tiempos variables, diferenciando tres etapas del proceso:

1. Latencia: Es producida de corta duración, manteniendo el plaguicida una determinada concentración.
2. Disipación: Es por lo general relativamente rápida su degradación en el suelo.
3. Persistencia: Es en la que el plaguicida introducido al suelo se degrada lentamente.

Los plaguicidas se aplican no solo a las tierras agrícolas; también tienen gran importancia en la protección de la salud humana, por ejemplo, para el control sanitario de plagas de enfermedades transmitidas por roedores. También se usan para mantener a las infraestructuras libres de insectos dañinos y malas hierbas, como sucede con la prevención del ataque de construcciones de madera por las termitas (McLaughlin y otros, 2019).

El problema surge cuando ocurre un mal uso de los plaguicidas al ser aplicados en cantidades superiores a las necesarias ya que estos reducen la fertilidad y alteran la microbiota benéfica del suelo. También facilitan la erosión y contaminación de fuentes de agua cercanas (McLaughlin y otros, 2019).

Silva y Correa (2009) mencionan que específicamente, el uso de sustancias tóxicas, como los plaguicidas, puede llegar a generar efectos negativos en el recurso suelo, debido a que sus características fundamentales como persistencia, vida media y toxicidad, entre otras, pueden destruir los componentes de este recurso y llevarlo a su destrucción.

3.3.3 Aire

La contaminación del aire por plaguicidas, bajo las condiciones de trabajo en el campo, está influenciados por las aplicaciones que se desarrollan a los cultivos siendo estos los causantes de contaminar el aire, sumando a ello las aplicaciones de herbicidas, y otras aplicaciones a los cultivos. No obstante, estos son trasladados por los flujos de vientos a zonas distantes que van contaminando la atmósfera, y por consiguiente la flora y fauna benéfica de los campos de cultivos, provocando la disminución de la biodiversidad (Castillo y otros, 2020).

El ingreso de plaguicidas en la atmósfera puede ocurrir durante el proceso de aplicación o por volatilización, bien sea al suelo o a la superficie de los cultivos, por acción del viento y los cambios que se producen en la temperatura y la humedad, permaneciendo estos en estado gaseoso o en estado de partículas (Castillo y otros, 2020).

3.4 Alternativas para la eliminación de plaguicidas en el medio ambiente

Cuando un plaguicida es liberado al medio ambiente, interacciona con los componentes bióticos y abióticos de éste, sufriendo transformaciones en su estructura, capaces de modificar profundamente sus características físico-químicas y su acción biológica. La degradación del plaguicida dará lugar a nuevos compuestos menos tóxicos que la sustancia original (García y Rodríguez, 1998).

Los tratamientos más habituales para la eliminación de plaguicidas se pueden dividir en tres grandes grupos:

3.4.1 Oxidación

Las tecnologías de oxidación forman parte de un grupo de procesos que tienen la capacidad de reducir o eliminar tanto la toxicidad como el volumen de contaminantes peligrosos. Los oxidantes más habitualmente utilizados son dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, ozono, fotólisis y ozono con radiación ultravioleta. El Cl_2O y el H_2O_2 tienen la ventaja de poder incorporarse con facilidad a medios ambientales donde se produce el tratamiento: agua, aguas residuales, lixiviados, suelos, etc. Pueden oxidar materiales peligrosos hasta su eliminación total en forma de moléculas inorgánicas o lo que es más habitual, transformar a los contaminantes en sustancias menos tóxicas o que son más fáciles de degradar por otros métodos (García y Rodríguez, 1998).

3.4.2 Tratamientos físicos

García y Rodríguez (1998) indican que las características fundamentales de estos tratamientos son su selectividad y la posibilidad de concentrar los contaminantes en una fase que se añade al medio, habitualmente suelos. Entre los tratamientos con uso potencial para la eliminación de pesticidas se encuentran:

- **Extracción con disolventes:** con esta técnica el contaminante puede aislarse y concentrarse, pero no destruirse. Suele ser viable económicamente cuando se trata de grandes volúmenes.
- **Lavado con surfactantes:** existen tecnologías de lavado ex-situ de suelos utilizando glicol o polietilenglicol.
- **Extracción con fluidos supercríticos:** suele realizarse con metanol y se alcanzan rendimientos entre el 50 y el 90 %.

3.4.3 Tratamientos biológicos

Los microorganismos son elementos importantes para el reciclado de carbono en la naturaleza. Convierten materia orgánica compleja en compuestos más simples. Mediante tratamientos biológicos pueden tratarse muchas sustancias indeseables en suelos, aire, sedimentos y residuos (García y Rodríguez, 1998).

Los tratamientos biológicos tienen muchas ventajas técnicas, por ejemplo, puede llegarse a la mineralización completa de los contaminantes, siendo muy escasa la contaminación que se transfiere a otros medios. Es poco “intrusiva” y generalmente no requiere grandes estructuras o componentes mecánicos complejos. Esta

tecnología es económica comparada con muchas otras alternativas y por ser un proceso natural goza de la aceptación de la sociedad (García y Rodríguez, 1998).

De acuerdo a García y Rodríguez (1998), la biodegradación de un contaminante en el ambiente depende de los microorganismos presentes, estos pueden pertenecer al medio (indígenas) o crecer en condiciones controladas y ser añadidos posteriormente al sistema para producir la degradación (exógenos). La velocidad de degradación es un importante parámetro porque afecta entre otras cosas a los costes. La velocidad del proceso está influenciada por:

- El pH: generalmente el pH ideal es el neutro, pero a veces puede variar entre 6 y 9. Debe tenerse en cuenta que los compuestos organoclorados al degradarse pueden generar ácido clorhídrico lo que hace disminuir el pH.
- La temperatura: cada tipo de microorganismo puede desarrollarse en un intervalo definido de temperatura. Los microorganismos mesófilos (20 - 45°C). Son los más habituales alcanzando la máxima velocidad metabólica a 25°C.
- La humedad: importante para la vida del microorganismo y como medio de transporte del sustrato. La humedad deseable en el suelo suele variar entre 25 y 85 % de la capacidad máxima del suelo.

3.5 *Serratia marcescens*

Según Silva (2010), la bacteria *Serratia marcescens* es un bacilo gramnegativo saprofito, que se encuentra en la tierra, agua e insectos. Es oxidasa negativa, fermentador de glucosa, produce DNAasa y no deamina lisina. Es correctamente identificado por los sistemas comerciales habituales. En la Figura 8, se puede observar que produce un pigmento rojo evidente en la mayoría de las cepas ambientales no así en cepas clínicas.

Figura 8

Serratia marcescens luego de 48 horas de incubación a 30 °C



Fuente: Department of Veterinary Disease Biology, 2011

3.5.1 Taxonomía de *Serratia marcescens*

A continuación, en la Tabla 1, se presenta la taxonomía característica de la bacteria *Serratia marcescens* descrita por Yunga (2021):

Tabla 1

Taxonomía de la bacteria Serratia marcescens

Taxonomía	
Formado por:	Bacilos Gram negativos con un tamaño de 0.9 a 2 µm de largo y con un diámetro de 0.5 a 0.8 µm.
Dominio:	*Bacteria*
Filo:	*Proteobacteria*
Sin rango:	*Rhodobacteria*
Clase:	*Grammproteobacteria*
Morfología:	Son bacilos cortos que frente a la tinción de Gram se colorean en rojo, es decir, son Gram negativos. No forma esporas. Poseen flagelos perítricos y lipopolisacáridos en su pared celular.

Fuente: Yunga, 2021

3.5.2 Medios de cultivo para bacteria *Serratia marcescens*

De acuerdo a Pérez y otros (2017), la bacteria *Serratia marcescens* crece abundantemente en agar chocolate, agar sangre y agar MacConkey; siendo capaz de producir colonias que pueden ser pigmentadas, ya que genera un pigmento rojo llamado prodigiosina. MacWilliams y Liao (2009) menciona que la bacteria *Serratia marcescens* también puede ser incubada en el medio de cultivo LB.

Agar MacConkey

Allen (2016) menciona que el agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos gramnegativos no exigentes, en particular miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Pseudomonas*.

Las bacterias gramnegativas que crecen en agar MacConkey pero que no fermentan la lactosa, como es el caso de *Serratia marcescens*, aparecen incoloras en el medio y el agar que rodea a las bacterias permanece relativamente transparente (Allen, 2016).

Agar sangre

El agar sangre garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia clínica tanto grampositivos como gramnegativos, hongos y levaduras, pudiendo observarse en este medio las características de hemolisis que algunos de ellos presentan sirviendo esto como base inicial para la correcta identificación del patógeno (CIRUMEDICS, 2023).

Agar chocolate

Según DIFCO (2009) el agar chocolate es un medio no selectivo para cultivo y aislamiento de microorganismos exigentes, especialmente de *Neisseria* y de muestras clínicas.

La base del agar chocolate contiene caseína y peptonas seleccionadas como fuentes de nitrógeno, con un pH controlado, la hemoglobina aporta la hemina (factor X) y el suplemento vitamínico que aporta entre otros el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido), esencial para las diferentes especies de *Haemophilus*, además de vitaminas, aminoácidos, coenzimas, glucosa, factores esenciales para el crecimiento de *Neisserias* patógenas y otros microorganismos exigentes (DIFCO, 2009).

Agar LB

El agar Luria (Luria Bertani LB) contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos; el cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico. El agar LB se utiliza para la identificación posterior de microorganismos de los cultivos que muestren desarrollo para posteriormente efectuar resiembras en medios de cultivos selectivos por estría cruzada. También funciona como un medio de enriquecimiento (PROBIOTEK, 2017).

3.6 Técnicas de sembrado

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento (Microbac, 2020).

Según Microbac (2020), las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

- Que se efectúen asépticamente
- Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados
- Que se realicen solo los manipuleos indispensables
- Que se trabaje fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien flujo laminar.

3.6.1 Siembra por estría en placa

Es el método más fácil y el más usado para obtener cultivos axénicos. Para ello, con un asa de siembra se toma una muestra de la población mixta y a continuación se hacen estrías sobre la superficie de un medio sólido preparado en una placa Petri (a las placas Petri también se les denomina simplemente placas), tal y como se observa en la Figura 9. Conforme se van haciendo estrías en zigzag con el asa, cada vez se van depositando en la superficie del medio menos microorganismos (Microbac, 2020).

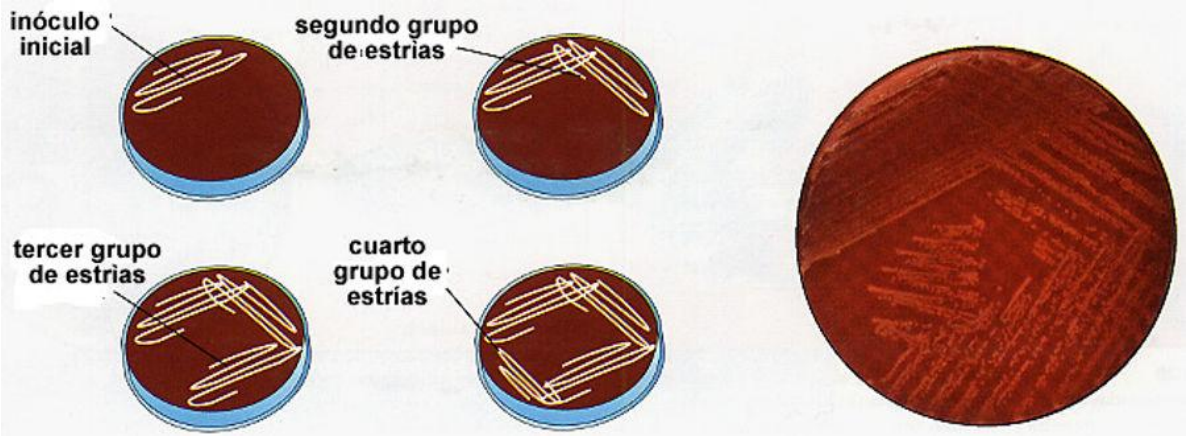
A continuación, se flamea el asa, se toca en la región donde se han realizado las últimas estrías y se continúa la siembra con la misma técnica, en la superficie de

medio sin sembrar aún. Repitiendo este proceso varias veces se logra separar células individuales. A continuación, las placas se incuban en un lugar adecuado, permitiendo que las células aisladas experimenten un número suficiente de divisiones para formar colonias visibles (Microbac, 2020).

Aunque cada colonia posiblemente representa un clon derivado de una sola célula, no podemos asegurarlo. Quizás, dos células quedaron depositadas tan juntas que han originado una única colonia mixta. Por tanto, para asegurarnos de que hemos obtenido un cultivo axénico, conviene repetir el procedimiento a partir de una colonia bien aislada en la primera placa. Las colonias que se desarrollen la segunda vez, serán, casi con toda seguridad, cultivos axénicos (Microbac, 2020).

Figura 9

Técnica de siembra por estría



Fuente: Wix Site, 2021

3.6.2 Siembra para aislamiento o recuento

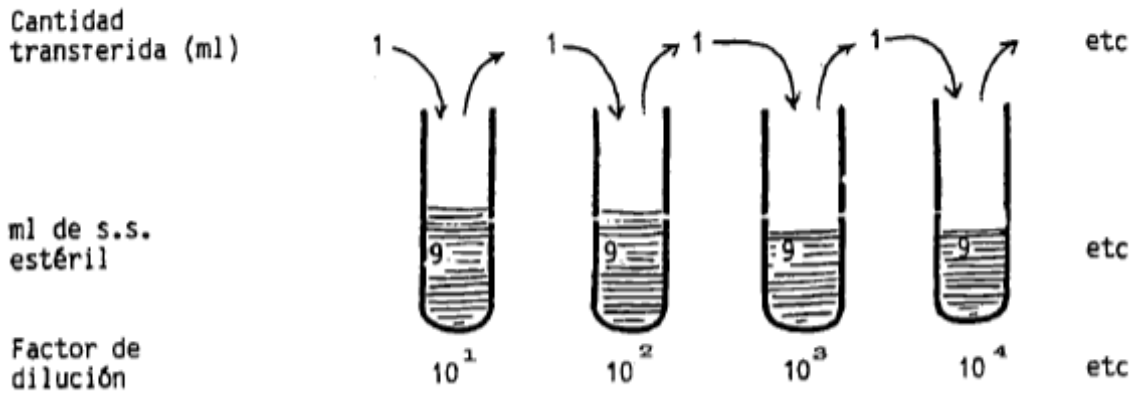
El método de aislamiento en placa por diluciones sucesivas consiste en diluir una muestra bacteriana original en una serie de tubos con diluyente estéril para reducir la densidad celular, describiéndose de tal forma en la Figura 10. A partir de cada dilución, se toma una alícuota y se coloca en una placa de Petri con agar, distribuyéndola uniformemente sobre la superficie del medio. Esto permite que, después de la incubación a la temperatura óptima, las bacterias crezcan formando colonias visibles y separadas en las diluciones más bajas (Sanz, 2011).

Cada colonia representa los descendientes de una bacteria, si bien en realidad resulta más exacto hablar de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) (Sanz, 2011).

De acuerdo a Sanz (2011) para el recuento se debe procurar la utilización de aquellas placas que contengan entre 30 y 300 colonias, para determinar así el número original de microorganismos en la muestra.

Figura 10

Técnica de diluciones sucesivas



Fuente: Sanz, 2011

3.7 Identificación microbiana

La identificación microbiana es el proceso mediante el cual se determina la identidad de un microorganismo específico dentro de una muestra. Este procedimiento permite clasificar y nombrar a los microorganismos en función de sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, genéticas y moleculares (COPISA, 2021).

3.7.1 Tinción de Gram

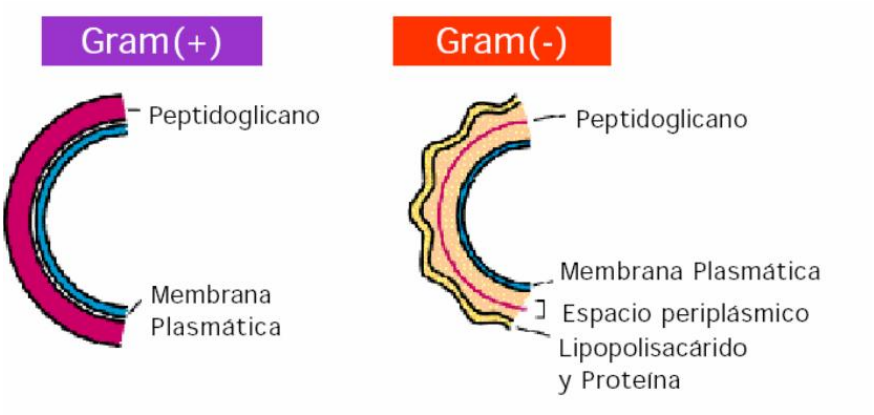
La Tinción de Gram es el procedimiento de tinción más ampliamente usado en bacteriología. Nos permite dividir a las bacterias en dos grandes grupos taxonómicos: Gram positivas y Gram negativas, según sea su comportamiento frente a la tinción (Universidad de las Palmas Gran Canaria, 2005).

Se cree que la diferencia en la coloración que adquieren los dos grupos de bacterias se debe a la distinta composición química de la pared celular. En la Figura 11, se muestra que las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de mureina o peptidoglicano (de 20 a 80 nm de espesor) en su pared, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano (2 nm) más fina y una capa más externa de lipopolisacáridos, lipoproteínas y lípidos (Universidad de las Palmas Gran Canaria, 2005).

Según Sanz (2011) las bacterias a las que se va a aplicar la tinción de Gram deben proceder de cultivos jóvenes (12 a 18 horas para las bacterias más comunes) con fase exponencial de crecimiento. Las bacterias Gram positivas en fase de crecimiento más tardío dan resultados irregulares en esta tinción.

Figura 11

Esquema general de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas

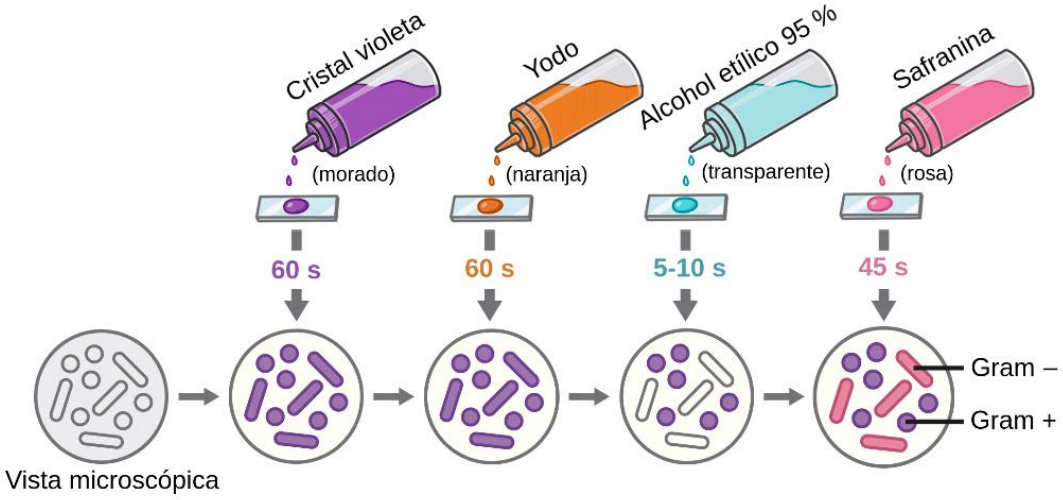


Fuente: Universidad de las Palmas Gran Canaria, 2005

La Figura 12, describe que la tinción requiere cuatro soluciones un colorante o tinte básico, un mordiente (sustancia que incrementa la afinidad entre la célula y el tinte), un decolorante (elimina el tinte de una célula teñida) y un segundo tinte o colorante de contraste (tinte de color diferente al inicial). Tras la tinción con el primer colorante (Cristal violeta) se efectúa una decoloración con etanol que arrastrará al colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas el colorante queda retenido y las células permanecerán azules. Las células Gram negativas se teñirán después con el colorante de contraste (safranina) para que puedan observarse.

Figura 12

Reactivos utilizados en la tinción de Gram



Fuente: Theory Labster, 2022

3.8 Cinética de crecimiento

La curva del crecimiento microbiano representa la evolución del número de número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio. Se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo de volumen limitado y con una cantidad de nutrientes limitada, como por ejemplo un medio de cultivo líquido en un matraz que ha sido inoculado con una cantidad inicial de microorganismos o inóculo (Bikandi, 2014).

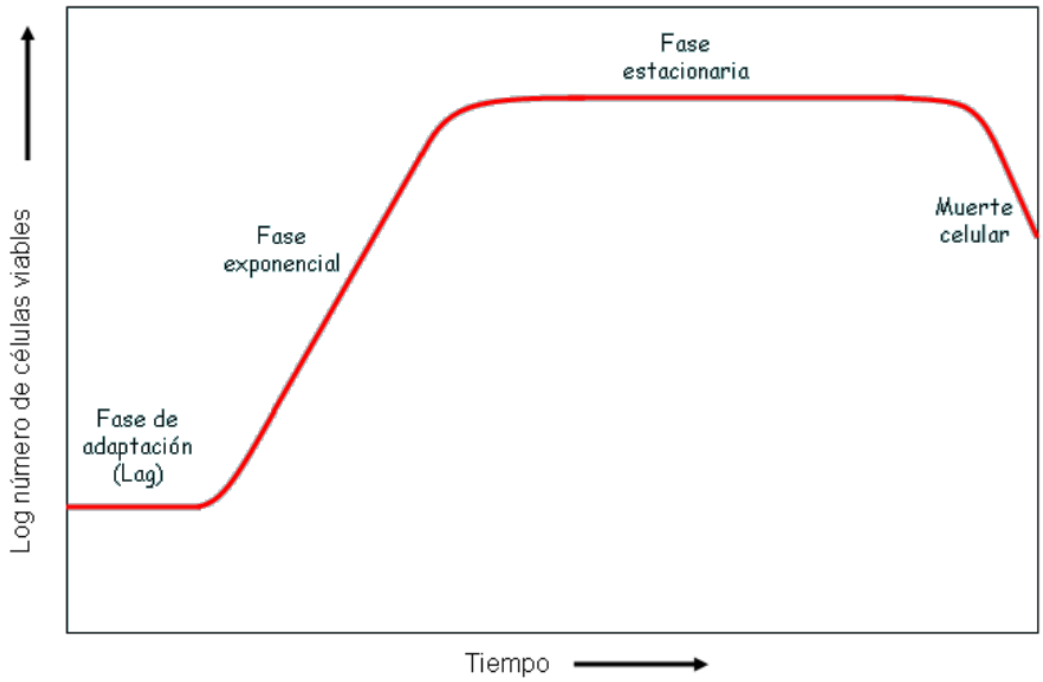
Según López (2016) en la curva de crecimiento se diferencian cuatro fases:

- Fase de retraso: Representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un periodo de ayuno nutrimental.
- Fase de crecimiento exponencial: Representa el periodo en el que hay suficientes nutrimentos; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente.
- Fase estacionaria: Representa el periodo de crecimiento nulo. Se define operacionalmente como el momento en el que el número de células en el cultivo no varía.
- Fase de muerte celular: En esta fase, la concentración de células microbianas comienza a disminuir. Esto ocurre debido a la escasez de nutrientes y reservas de energía en el medio de cultivo, lo que provoca la autolisis o muerte celular.

Las cuatro fases descritas anteriormente se muestran en la Figura 13.

Figura 13

Curva de crecimiento bacteriano



Fuente: López, 2016

La fase de crecimiento exponencial es la que presenta mayor interés por ser la fase en la que el incremento del número de microorganismos es máximo. Durante esta fase el tiempo de generación de los microorganismos (el tiempo que la población de microorganismo necesita para duplicar su número) se mantiene constante (Bikandi, 2014).

3.9 Curva de calibración (UFC/mL vs Absorbancia)

De acuerdo a Díaz (2011) para realizar ensayos microbiológicos bajo condiciones equivalentes es necesario trabajar con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar. Una de las formas de medir la biomasa y determinar las fases de crecimiento de la misma es utilizando un método que relacione dicha biomasa con una magnitud física tal como la absorbancia de luz. Para estas determinaciones se utiliza un espectrofotómetro, en el cual la luz atraviesa un tubo conteniendo el cultivo bacteriano.

El cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo (I_0) y la transmitida (I) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia (A). A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula. Esta reducción de la intensidad de luz transmitida es consecuencia de la difracción de la luz por parte de las células. Sin embargo, la absorbancia no es una medida directa del número de células, por lo cual es necesario realizar una curva de calibración para obtener la correspondencia entre las medidas de la biomasa en el cultivo y las de absorbancia (medidas a 600 nm de longitud de onda) (Díaz, 2011).

3.10 Espectrofotometría UV/Vis

Es conocida la naturaleza dual que posee la tanto con propiedades corpusculares como ondulatorias. De esta forma algunos fenómenos es posible interpretarlos a la luz del modelo ondulatorio de la luz, así como otros pueden ser estudiados desde el modelo de la luz como un conjunto de partículas elementales llamadas fotones. Las propiedades básicas de la luz son su longitud de onda (distancia entre picos adyacentes (o valles), y se designa frecuentemente en nanómetros) y su frecuencia (es el número de ciclos de onda que pasan por un punto fijo por unidad de tiempo; y se mide en ciclos por segundo o Hertz - Hz) (Castellanos y otros, 2018).

Cuando un haz de luz blanca pasa a través de una sustancia coloreada, una porción de las longitudes de este rango es absorbida, mientras que el restante conjunto de longitudes de onda es reflejado; fenómeno que origina el color de los cuerpos, y en el que se basa la espectrofotometría de absorción UV-Vis (Castellanos y otros, 2018).

La espectrofotometría UV/Vis es una técnica no destructiva, lo que permite reutilizar las muestras o continuar con su procesamiento o análisis. Se pueden realizar mediciones rápidamente, lo que permite una fácil integración en protocolos experimentales (Castillo A. , 2022).

La espectrofotometría UV-Vis se ha visto aplicada a diversas situaciones, como los análisis de ADN y ARN, ya que mediante esta técnica se puede realizar una verificación rápida de la pureza y la concentración del ADN o ARN que se quiera

estudiar en cuestión, así como en cultivos bacterianos y se usa regularmente dado que se prefiere debido a las propiedades ópticas de los medios de cultivo bacterianos en los que se cultivan y para evitar dañar las células, mismo también como en análisis en bebidas, debido a que la luz ultravioleta puede facilitar la cuantificación de ciertos compuestos (Castillo A. , 2022).

Entre las diferentes aplicaciones que se le ha dado a la espectrofotometría UV-Vis es también a los análisis plaguicidas por lo que es una herramienta precisa para medir concentraciones de contaminantes a partir del espectro que se genera.

IV HIPÓTESIS

En el presente estudio se proponen tres hipótesis de investigación, las cuales están directamente relacionadas con los objetivos específicos del trabajo. Estas hipótesis se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2

Descripción de las hipótesis planteadas para el estudio

Hipótesis Nulas	Hipótesis Alternativas
$H_{0,1}$: La cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* no se ve afectada por la concentración de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone.	$H_{A,1}$: La cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* se ve afectada por la concentración de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone.
$H_{0,2}$: No hay una biodegradación significativa de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone en presencia de *Serratia marcescens*.	$H_{A,2}$: Existe una biodegradación significativa de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone en presencia de *Serratia marcescens*.

Fuente: Elaboración propia

V METODOLOGÍA

Este capítulo detalla la metodología utilizada en el desarrollo de la presente investigación.

5.1 Ámbito de estudio

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (UNI-PIENSA), ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar de la Universidad Nacional de Ingeniería en la ciudad de Managua, Nicaragua.

5.2 Reactivación de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana *Serratia marcescens*, utilizada en este estudio, había sido previamente aislada y fue proporcionada por el banco de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (UNI-PIENSA). Dicha cepa se obtuvo a partir de una muestra de leche fresca en La Libertad, Chontales, en octubre de 2019 y se mantuvo preservada en placas Petri con agar nutritivo a una temperatura controlada de 4 °C, con activaciones cada tres meses.

Durante el proceso de reactivación la cepa bacteriana de *Serratia marcescens* (código QIE-08), pasó del estado de latencia a la recuperación normal de su viabilidad, funcionamiento de las rutas metabólicas y crecimiento (Flores y Fernández, 2016).

5.2.1 Preparación del medio de cultivo sólido

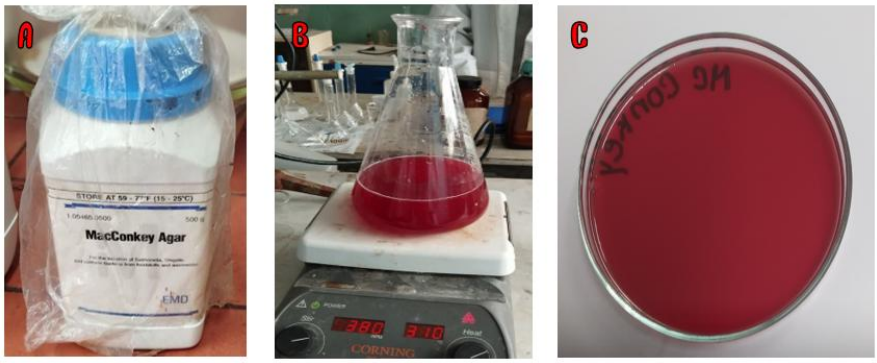
La preparación del medio de cultivo sólido fue fundamental para proporcionar los nutrientes y las condiciones óptimas para el crecimiento de *Serratia marcescens*. Se empleó Agar MacConkey (Figura 14 A), que según Allen (2016) es un medio de cultivo selectivo diseñado para favorecer el desarrollo de bacterias gramnegativas. El medio fue suministrado por el Laboratorio de Alimentos de la Dirección de Área de Conocimiento de Agricultura (DACA).

El procedimiento inició con la disolución de 50 g de Agar MacConkey en 1 L de agua destilada. Esta solución se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2 L, calentándose sobre una placa calefactora y utilizando un agitador magnético para mantener la solución en movimiento constante y garantizar una mezcla homogénea. La mezcla se llevó hasta el punto de ebullición (Figura 14 B).

Posteriormente, se dispensaron aproximadamente 15 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo, que fueron esterilizados en la autoclave YAMATO SQ810C a 121 °C (Ver Figura 34 en Anexos) durante 15-20 minutos. Para confirmar la esterilización, se colocó cinta indicadora en cada tubo y se verificó el cambio de color como evidencia de un proceso exitoso. Finalmente, el medio de cultivo se vertió en placas Petri, realizando este paso cerca de un mechero Bunsen para minimizar el riesgo de contaminación (Figura 14C).

Figura 14

Preparación del medio Agar MacConkey. (A) Medio de cultivo en su envase. (B) Disolución del medio de cultivo en la plancha calefactora con agitación. (C) Placa petri con el medio de cultivo solidificado



Fuente: Elaboración propia

5.2.2 Siembra por agotamiento en estrías

La siembra por agotamiento en estrías tuvo como objetivo obtener, a partir de un elevado número de bacterias, una distribución reducida de ellas sobre la superficie del medio de cultivo sólido. Al incubar la placa y permitir el crecimiento bacteriano, cada bacteria generó una colonia (García, 2009).

El proceso inició con la esterilización del asa de siembra, calentándola sobre la llama de un mechero Bunsen hasta alcanzar un estado de rojo incandescente. Una vez esterilizada, se dejó enfriar ligeramente antes de tomar una muestra de la cepa *Serratia marcescens*.

Posteriormente, la muestra fue inoculada en el medio de cultivo, deslizando el asa según el esquema presentado en la Figura 8. Las placas inoculadas se incubaron en posición invertida a una temperatura de 37 °C durante un mínimo de 24 horas (Ver Figura 35 en Anexos). Este procedimiento se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados (Figura 15).

Figura 15

Siembra de Serratia marcescens con la técnica por agotamiento en estrías



Fuente: Elaboración propia

5.2.3 Comprobación de la pureza bacteriana

Para comprobar la pureza de la cepa *Serratia marcescens* previamente cultivada, se llevó a cabo la tinción de Gram, con el fin de determinar su morfología según lo descrito por Yunga (2021).

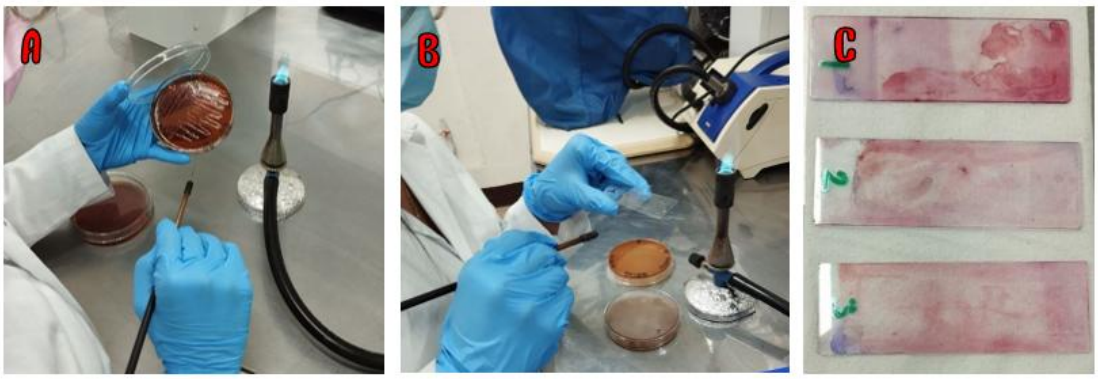
La tinción de Gram se realizó en tres etapas. En la primera, se preparó el frotis colocando una gota de agua destilada sobre un portaobjetos limpio. Con un asa de siembra previamente esterilizada en un mechero Bunsen, se tomó una pequeña cantidad de la muestra bacteriana como se observa en la Figura 16 A, y se mezcló con el agua, extendiéndola uniformemente para formar un frotis delgado (Figura 16 B). Luego, el frotis se secó al calor de la llama del mechero y, una vez seco, se fijó pasándolo tres veces sobre la llama.

En la segunda etapa, se llevó a cabo la tinción del microorganismo. Se cubrió el frotis con cristal violeta durante un minuto y posteriormente se enjuagó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Luego, se aplicó yodo durante un minuto para fijar el colorante primario y se enjuagó nuevamente. A continuación, se decoloró el frotis con alcohol-cetona y, posteriormente, se añadió safranina durante 45 segundos como colorante de contraste. Finalmente, se enjuagó con agua destilada y se secó al calor de la llama del mechero Bunsen (Figura 16 C).

En la tercera y última etapa, se identificaron las características morfológicas observando el portaobjetos bajo un microscopio OLYMPUS BH-2 (Ver Figura 36 en Anexos) a 100 aumentos, utilizando aceite de inmersión para mejorar la resolución y la calidad de la imagen. Se esperó visualizar bacilos gramnegativos de color rojo, tal como lo describe Yunga (2021).

Figura 16

Proceso de tinción de Gram. (A) Toma de muestra del microrganismo. (B) Preparación del frotis. (C) Frotis teñido para observación microscópica



Fuente: Elaboración propia

5.3 Espectro UV/Vis plaguicidas 2,4-D y Gramoxone

Se preparó una solución de 20 mg/L de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone, respectivamente. Posteriormente, se realizó el escaneo del espectro UV/Vis de las soluciones en el espectrofotómetro Hatch DR 6000 (Ver Figura 37 en Anexos),

abarcando un rango de 200 nm a 750 nm, con el propósito de determinar el pico de absorbancia de cada plaguicida. Las mediciones se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Las mediciones posteriores, destinadas a la curva de calibración de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone, se realizaron a la longitud de onda correspondiente al pico de absorbancia registrado.

5.4 Curva de calibración plaguicidas 2,4-D y Gramoxone (Concentración (%) vs Absorbancia)

Se prepararon soluciones de 10 mg/L de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone. En tubos de ensayo, se dispusieron aproximadamente 10 mL de las soluciones madre al 100, 80, 60, 40, 20, 10 y 5 % de concentración.

Posteriormente, se llevaron a cabo mediciones de absorbancia en el espectrofotómetro Hatch DR 6000 a la longitud de onda correspondiente al pico de absorbancia de cada plaguicida. Estas mediciones se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración, permitiendo así generar la curva de calibración. Esta curva facilitó la determinación de la concentración óptima de los plaguicidas a la cual se registraron los valores de absorbancia más viables.

5.5 Curva de calibración bacteriana (UFC/mL vs Absorbancia)

Para la realización del principal ensayo de esta investigación, fue necesario trabajar con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar, tal como menciona Díaz (2011). Por ello, se estableció la relación entre las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y la absorbancia.

5.5.1 Preparación del Medio Líquido Mineral (MLM)

El MLM es una mezcla compuesta principalmente por sales inorgánicas esenciales, sin presencia de fuentes de carbono orgánico, lo cual lo hace adecuado para estudios microbiológicos que requieren evaluar el uso de compuestos específicos como única fuente de carbono. En este estudio, el MLM se preparó conforme a la metodología descrita por Gómez y otros (2018) y fue empleado tanto para la elaboración de la curva de calibración bacteriana, como para los posteriores ensayos de biodegradación de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D.

La composición del medio líquido mineral incluyó (para un 1 L de agua destilada):

- 3 g de K_2HPO_4
- 3 g de KH_2PO_4
- 1 g de $(NH_4)_2SO_4$
- 0.0005 g de $CaCl_2.2H_2O$
- 0.0005 de $MgSO_4$
- 0.000125 g de $CuSO_4.5H_2O$
- 0.000125 g de $MnSO_4$
- 0.000125 g de $CoCl_2.6H_2O$

- 0.000125 g de $(NH_4)_2MoO_4.4H_2O$
- 0.000125 g de H_3BO_3
- 0.000125 g de $ZnSO_4.7H_2O$
- 0.000125 g de $FeSO_4$

5.5.2 Siembra en medio líquido

Una vez confirmada la pureza bacteriana, el cultivo fue transferido a MLM para proporcionar las condiciones necesarias para el crecimiento en suspensión, lo que facilitó la realización de diluciones seriadas. El procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia, utilizando un mechero Bunsen encendido.

Inicialmente, se tomó un erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de MLM, se esterilizó la boca del erlenmeyer al pasarlo por la llama del mechero y se esterilizó el asa de siembra. Luego, se tomó una pequeña porción del cultivo en medio sólido y se transfirió al caldo. Posteriormente, se pasó nuevamente la boca del erlenmeyer por la llama antes de taparlo con algodón. Este procedimiento se realizó por duplicado. Los erlenmeyers fueron agitados a 200 rpm en un incubador orbital a 30 °C durante 24 horas, permitiendo el desarrollo óptimo del cultivo en el medio líquido.

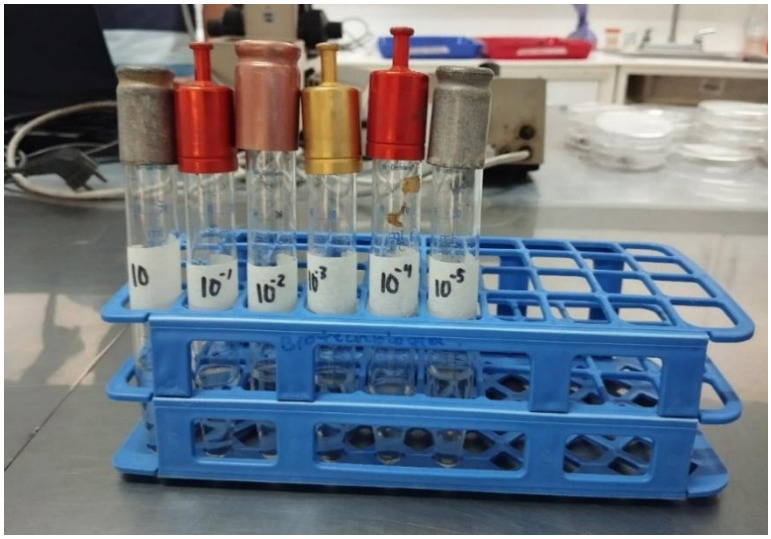
5.5.3 Diluciones seriadas

Se llevaron a cabo diluciones seriadas hasta 10^{-5}. Para ello, se prepararon 6 tubos de ensayo con 9 mL de solución salina estéril, además de un tubo con MLM (10), el cual sirvió como punto de partida para la serie de diluciones.

En el segundo tubo (10^{-1}), se añadió 1 mL de la suspensión bacteriana inoculada en MLM, utilizando una micropipeta. Luego, la solución fue agitada rápidamente en un vórtex y se transfirió 1 mL al siguiente tubo para alcanzar una dilución de 10^{-2}. Este proceso se repitió sucesivamente hasta obtener la dilución final de 10^{-5} (Figura 17).

Figura 17

Diluciones seriadas para el recuento en placa



Fuente: Elaboración propia

5.5.4 Recuento en placas

Posteriormente, se sembró por duplicado 0.1 mL de las últimas tres diluciones (10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}) y se distribuyó mediante movimientos circulares sobre la placa con medio agar MacConkey, utilizando un asa de Drigalsky. La placa se incubó de manera invertida a 37 °C durante 24 horas.

De acuerdo a Sanz (2011), para el recuento se procura utilizar aquellas placas que contengan entre 30 y 300 colonias. El número original de microorganismos en la muestra está dado por la ecuación 1:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \text{N° colonias} * \frac{1}{\text{dilución}} * \frac{1}{\text{volumen sembrado}} \qquad (\text{Ec. } 1)$$

Luego de la incubación, se contó el número de colonias visibles en las placas y se multiplicó por el factor de dilución correspondiente para determinar el número de UFC/mL mediante la ecuación 1. A partir del número de UFC/mL en cualquiera de las diluciones sembradas, se estimó la concentración de biomasa en las diluciones previas, aumentando progresivamente la concentración a medida que la dilución disminuyó.

5.5.5 Medición de absorbancia

Se midió la absorbancia de cada una de las diluciones preparadas previamente. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro Hatch DR 6000 a una longitud de onda de 600 nm, dentro del espectro UV/Vis, en el cual los medios de cultivo presentan una absorción mínima, permitiendo así mediciones más precisas (López, 2024).

Con los valores obtenidos de UFC/mL y absorbancia de cada una de las diluciones seriadas, se construyó la curva de calibración de la bacteria *Serratia marcescens*.

5.6 Evaluación de biodegradación *Serratia marcescens* en presencia de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D como fuentes de carbono

En este acápite, se llevó a cabo la evaluación de biodegradación de *Serratia marcescens* en presencia de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone como fuentes de carbono, siguiendo la metodología descrita por Gómez y otros (2018).

5.6.1 Preparación de preinóculos

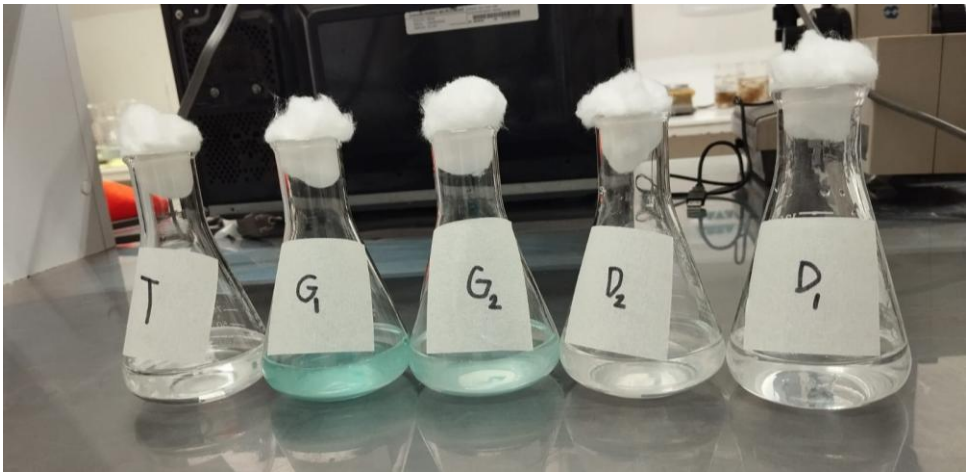
Según López (2024), la preparación de preinóculos permite la adaptación de las células bacterianas al medio líquido y facilita su multiplicación activa. Esta fase de adaptación resulta esencial, especialmente para bacterias provenientes de un medio sólido o de condiciones de cultivo distintas.

Se prepararon cuatro matraces Erlenmeyer de 125 mL, cada uno con 50 mL de MLM. A dos de ellos se les añadieron 1 mg de cada plaguicida para alcanzar una concentración de 20 mg/L, mientras que en los otros dos se agregaron 0.5 mg de cada plaguicida, obteniendo una concentración de 10 mg/L. En todos los matraces se inocularon cuatro asadas de la cepa *Serratia marcescens*.

Adicionalmente, se preparó un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de MLM y cuatro asadas de la bacteria, el cual fue utilizado como testigo (Figura 18).

Figura 18

Preparación de preinóculos

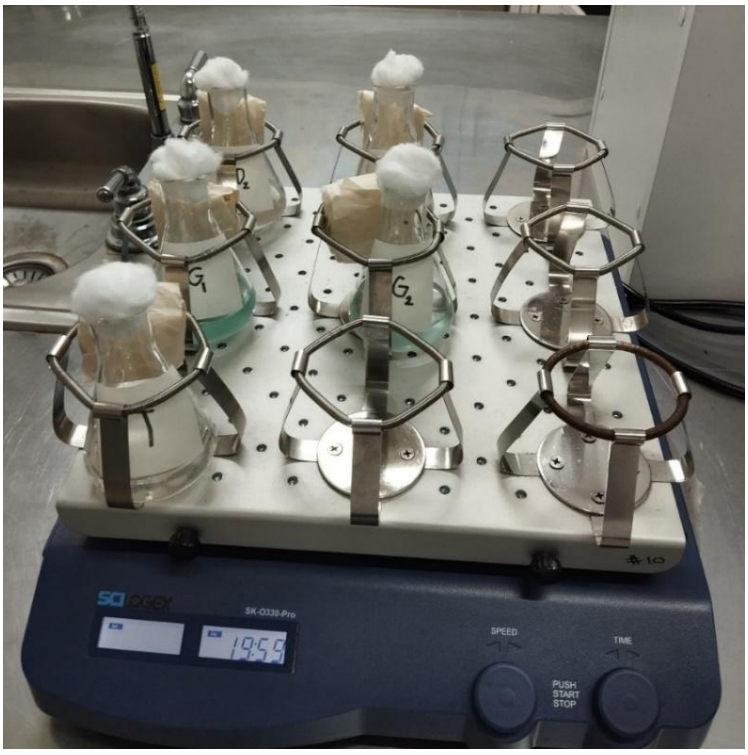


Fuente: Elaboración propia

Posteriormente las muestras fueron agitadas a 200 rpm en un incubador orbital a 30 °C durante 24 horas (Figura 19).

Figura 19

Agitación de preinóculos a 200 rpm y 30 °C



Fuente: Elaboración propia

5.6.2 Preparación de inóculos

Se prepararon seis matraces Erlenmeyer de 250-300 mL, correspondientes a los plaguicidas en sus diferentes concentraciones, además de un blanco y un testigo. La composición de los contenidos en los matraces se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3

Contenido de matraces Erlenmeyer en la preparación de los inóculos

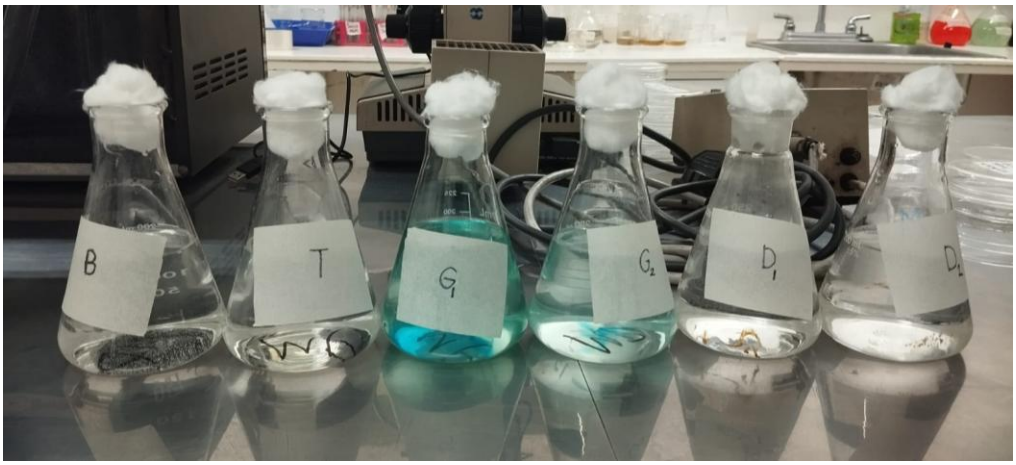
Matraces Erlenmeyer	Contenido
B: Blanco	200 mL de MLM
T: Testigo	180 mL de MLM
G_1: 2,4-D (20 mg/L)	180 mL de MLM + 3.6 mg de Gramoxone
G_2: Gramoxone (10 mg/L)	180 mL de MLM + 1.8 mg de Gramoxone
D_1: 2,4-D (20 mg/L)	180 mL de MLM + 3.6 mg de 2,4-D
D_2: Gramoxone (10 mg/L)	180 mL de MLM + 1.8 mg de 2,4-D

Fuente: Elaboración propia

Para lograr un volumen final de 200 mL, los matraces Erlenmeyer T, G_1, G_2, D_1 y D_2 fueron inoculados con un 10% del volumen final (20 mL) de los preinóculos preparados con anterioridad (Figura 20).

Figura 20

Preparación de inóculos



Fuente: Elaboración propia

Los matraces se colocaron en un incubador orbital a 30 °C, con agitación a 200 rpm durante 24 horas. El tiempo inicial se estableció como t_0, momento en el que se realizaron las primeras mediciones de absorbancia a la longitud de onda registrada como pico en el acápite 5.4 para cada uno de los plaguicidas.

Se efectuaron mediciones de absorbancia cada 60 minutos durante las primeras seis horas del experimento. Para ello, se centrifugó 20 mL de las muestras a 2000

rpm por 10 min, tomándose muestras de 4 mL del sobrenadante, las cuales fueron colocadas en celdas para su análisis en un espectrofotómetro. Este procedimiento se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Mediciones adicionales se llevaron a cabo al completarse las 24 horas del proceso.

A partir de los valores de absorbancia registrados y mediante el uso de la curva de calibración bacteriana, se podrá aproximar el crecimiento de *Serratia marcescens* (medido en UFC/mL) en presencia de los plaguicidas seleccionados. Mediante el uso del software MatLab se podrá ajustar los valores registrados en este acápite en una curva característica dada por la ecuación 2:

$$y = X_0 + \frac{\Delta X}{1 + e^{-\mu(t - t_{exp})}} \quad (Ec. 2)$$

Donde:

X_0: Concentración inicial de células bacterianas, UFC/mL

ΔX: Incremento en la concentración de células bacterianas, UFC/mL

μ: Factor de crecimiento bacteriano

t_{exp}: Tiempo donde se registra la máxima rapidez de crecimiento bacteriano, h

Esta función logística destaca como un modelo eficaz y ampliamente utilizado para describir el crecimiento de poblaciones, incluido el crecimiento bacteriano. Estos parámetros son cruciales para comprender la dinámica del crecimiento bacteriano y pueden variar dependiendo de las condiciones del medio y las características de la cepa bacteriana (López D. , 2024).

La degradación de los plaguicidas, expresada en porcentaje, se determinó mediante la ecuación 3:

$$\%\text{Degradación} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (Ec. 3)$$

Donde C_0 es la concentración inicial de los plaguicidas (en mg/L) y C_t es la concentración de los plaguicidas (en mg/L) en un tiempo t. Los valores de C_t se determinarán al establecer una relación con la absorbancia a partir de la ecuación de Lambert-Beer.

5.7 Diseño experimental

Según lo mencionado por Montgomery (2004), se propone un diseño experimental comparativo simple con el fin de determinar si dos tratamientos diferentes producen resultados equivalentes, evaluando así la efectividad de la biodegradación de plaguicidas por la bacteria *Serratia marcescens*.

El diseño experimental contempla dos tratamientos principales: los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone. Además, se han establecido tres niveles de concentración correspondientes a cada plaguicida.

En la Tabla 4, se presenta el diseño experimental utilizado para evaluar la biodegradación de 2,4-D y Gramoxone por *Serratia marcescens*.

Tabla 4

Niveles y tratamientos considerados para evaluar la biodegradación de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone por la bacteria Serratia marcescens

	Niveles	
Tratamientos	C_1	C_2
2,4-D	10 mg/L	20 mg/L
Gramoxone	10 mg/L	20 mg/L

Fuente: Elaboración propia

Además de los tratamientos experimentales, se incluyeron un testigo y un blanco. El blanco, al contener únicamente el medio de cultivo, permite establecer un control de calidad en las lecturas de absorbancia y sirve como punto de referencia para el espectrofotómetro. Por su parte, el testigo se utilizó para observar el crecimiento de la bacteria en condiciones estándar, sin la presencia de plaguicidas, con el fin de comparar los efectos generados por dichos compuestos sobre el desarrollo microbiano.

La selección de estos tratamientos se fundamenta en que, según Ebanks y otros (2015), estos plaguicidas son los de mayor uso en diversas regiones del país. Por otro lado, los niveles de concentración fueron establecidos a partir de los valores obtenidos en el acápite 5.3.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se muestran los resultados obtenidos a partir de la metodología desarrollada.

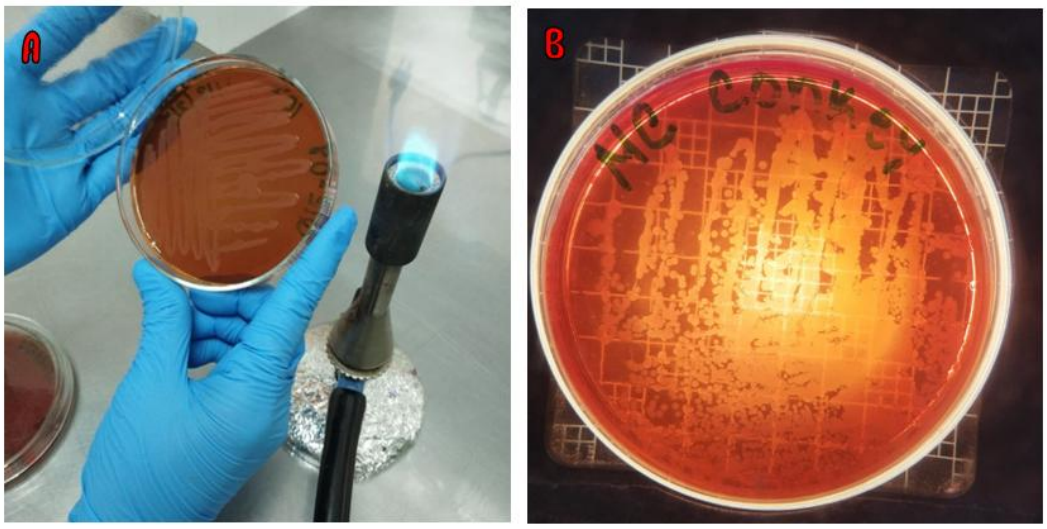
6.1 Reactivación de la cepa bacteriana

La reactivación de la cepa *Serratia marcescens* se llevó a cabo mediante la técnica de siembra por agotamiento en estría, lo que permitió la recuperación de su viabilidad y funcionalidad metabólica tras su preservación. Esta técnica facilitó la obtención de colonias aisladas, ya que según IEQFB (2024), con esta técnica se reduce la cantidad de microorganismos en cada pasada, lo que permite obtener colonias bien separadas y facilita el análisis morfológico de los microorganismos.

Después de la incubación de las placas de agar a 37 °C durante 24 horas, se observó la formación de colonias con características morfológicas distintivas, confirmando que la cepa reactivada correspondía a la esperada. En las placas se evidenciaron colonias de tamaño mediano, con superficie convexa, color amarillo, textura brillante y cremosa. Además, se identificó una morfología rizoide con bordes lobulados (Figura 21). Estas observaciones coinciden con el estudio realizado por Delgado y Fonseca (2019), donde identificaron las características morfológicas de *Serratia marcescens* y otros microorganismos.

Asimismo, el color amarillento observado sugiere la ausencia de fermentación de lactosa, lo que concuerda con lo reportado por Dahal (2023), quien señala que en agar MacConkey *Serratia marcescens* forma colonias lisas, elevadas, circulares y no fermentadoras de lactosa, evidenciado por la falta de coloración rosada. Estas observaciones sugieren que la metodología aplicada fue adecuada y no comprometió la identidad ni la viabilidad del microorganismo.

Figura 21 *Crecimiento de Serratia marcescens tras 24 horas de incubación en medio Agar MacConkey. (A) Observación en placa. (B) Visualización en un contador de colonias*



Fuente: Elaboración propia

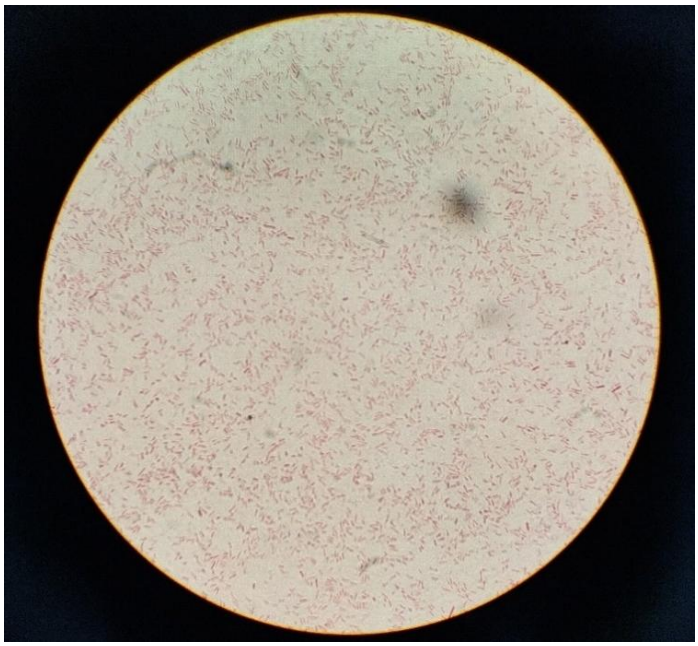
6.2 Comprobación de la pureza bacteriana

La comprobación de la pureza bacteriana se realizó mediante la tinción de Gram, lo que permitió caracterizar morfológica y estructuralmente a la cepa en estudio. Tras la observación microscópica, se identificaron bacilos Gram negativos cortos, dispuestos en cadenas cortas, características que coinciden con las descritas por Yunga (2021) referente a la caracterización taxonómica de *Serratia marcescens* (Figura 22).

Estas observaciones son respaldadas de igual manera por Delgado y Fonseca (2019) y Dahal (2023), quienes también describen la morfología de *Serratia marcescens* como bacilos cortos de disposición irregular o en cadenas cortas, con una estructura celular característica de las bacterias Gram negativas.

Estos resultados confirman la pureza del aislamiento y sugieren que el proceso de reactivación y siembra no favoreció la proliferación de contaminantes. De acuerdo a la Universidad de las Palmas Gran Canaria (2005), la tinción de Gram es un método clave en la identificación bacteriana, ya que permite diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas según la composición de su pared celular. En este caso, la coloración roja observada bajo el microscopio respalda la identidad de *Serratia marcescens* como una bacteria Gram negativa.

Figura 22 *Observación de Serratia marcescens bajo el microscopio*



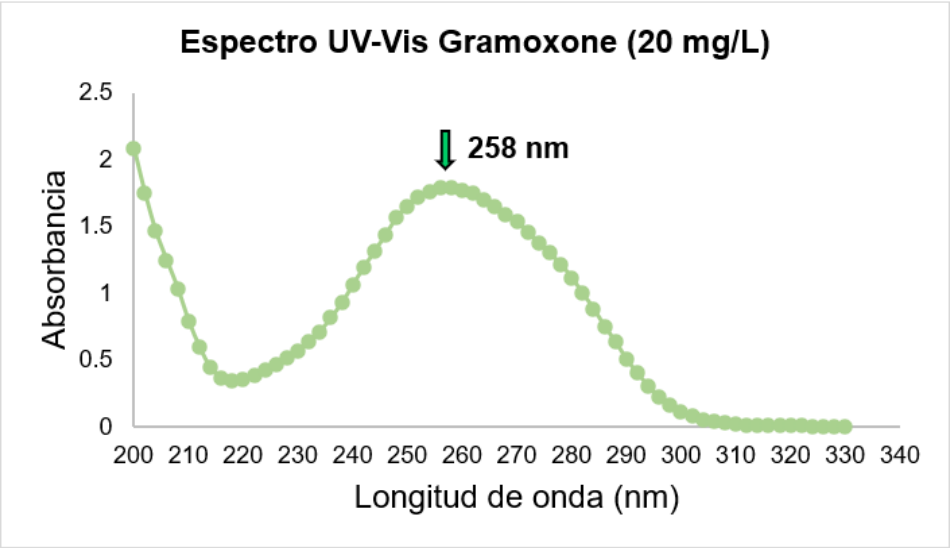
Fuente: Elaboración propia

6.3 Espectro UV/Vis Gramoxone y 2,4-D

Para la determinación de la longitud de onda de análisis de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D, se empleó un método analítico basado en la absorción UV/Vis, seleccionando aquella longitud de onda en la que se presentó la máxima absorción de radiación, de acuerdo con lo reportado por Amaya y otros, 2023.

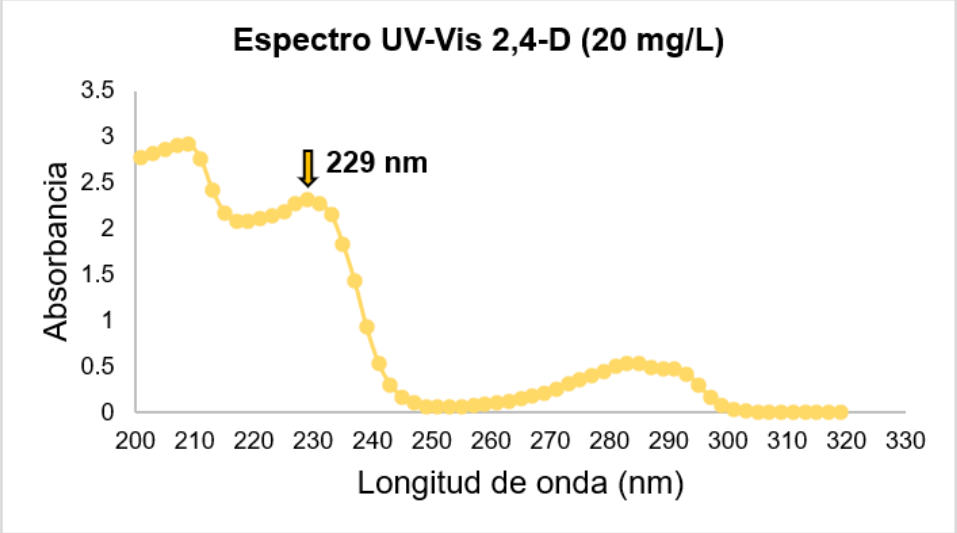
En las Figuras 23 y 24 se presentan los espectros UV/Vis de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D a una concentración de 20 mg/L.

Figura 23 *Espectro UV/Vis de Gramoxone (20 mg/L)*



Fuente: Elaboración propia

Figura 24 *Espectro UV/Vis de 2,4-D (20 mg/L)*



Fuente: Elaboración propia

Se observó que ambos compuestos mostraron sus mayores picos de absorbancia aproximadamente a los 200 nm. Sin embargo, estos valores no fueron seleccionados para los experimentos posteriores, ya que se encontraban cercanos al límite de detección del espectrofotómetro, lo que podría comprometer la precisión de las mediciones.

Como alternativa, se seleccionaron las longitudes de onda de 258 nm para Gramoxone y 229 nm para 2,4-D, donde se observaron picos de absorbancia definidos y dentro de un rango adecuado. Además, se observó que ambos plaguicidas presentaron absorbancias prácticamente nulas a partir de los 300 nm. Los valores de absorbancia obtenidos y utilizados para la construcción de las Figuras 24 y 25 se presentan en las Tablas 8 y 9 en Anexos.

6.4 Curva de calibración plaguicidas 2,4-D y Gramoxone (Concentración (%) vs Absorbancia)

Se determinó la relación entre la concentración de los plaguicidas y su absorbancia mediante la construcción de curvas de calibración a partir de los datos obtenidos con el espectrofotómetro. Las lecturas se realizaron por triplicado a las longitudes de onda previamente seleccionadas: 258 nm para Gramoxone y 229 nm para 2,4-D.

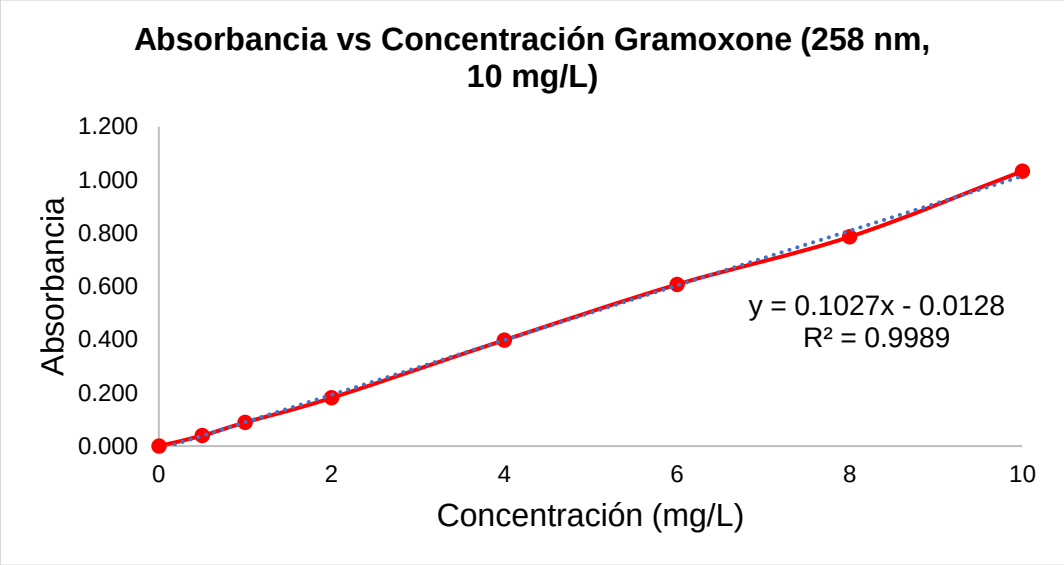
Se registraron los valores de absorbancia de las soluciones preparadas a una concentración 10 mg/L de cada uno de los plaguicidas; contando con un total de siete diluciones cada una (5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100%). En la Figura 25 y 26 se muestra la curva de calibración de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D respectivamente.

Según Clark (2016) se esperaba que la relación entre la concentración de los plaguicidas y su absorbancia siguiera un comportamiento lineal, de acuerdo con la Ley de Beer-Lambert, la cual establece que, en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la sustancia. El grado de ajuste lineal observado en las curvas de calibración confirma la validez de esta ley dentro del rango de concentraciones evaluado, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9989$ para Gramoxone y $R^2 = 0.9949$ para 2,4-D.

Además de confirmar la relación entre absorbancia y concentración, las curvas de calibración serán fundamentales en la siguiente etapa del estudio, dado que se busca monitorear la biodegradación de los plaguicidas. El análisis de las mediciones de absorbancia permitirá evaluar su comportamiento a lo largo del tiempo y determinar la reducción de su concentración en presencia de la bacteria.

Figura 25

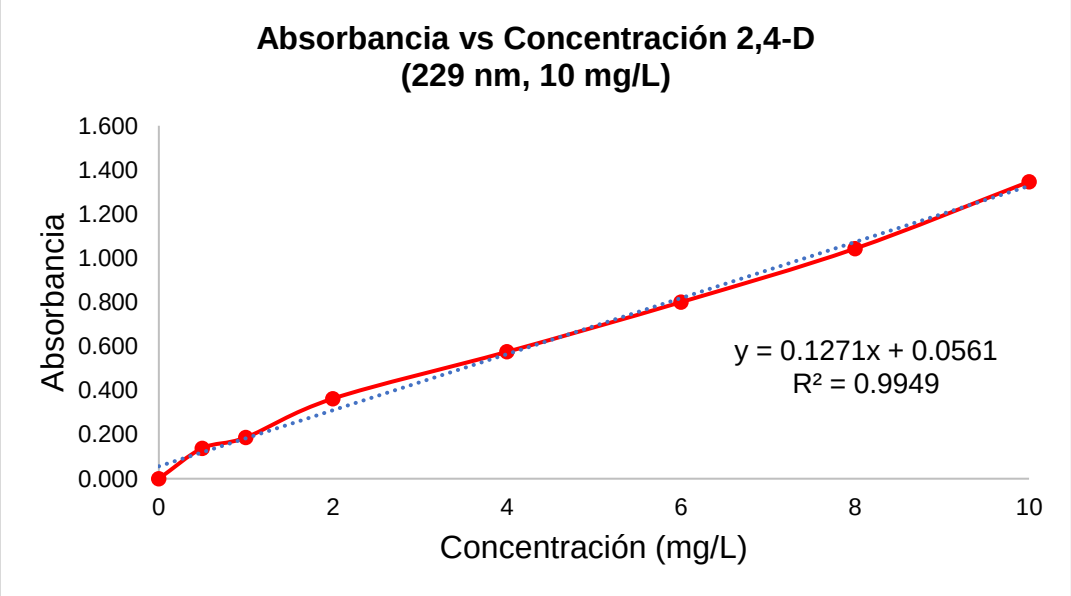
Curva de calibración Gramoxone (258 nm, 10 mg/L)



Fuente: Elaboración propia

Figura 26

Curva de calibración 2,4-D (229 nm/ 10 mg/L)



Fuente: Elaboración propia

Los valores de absorbancia obtenidos y utilizados para la construcción de las Figuras 25 y 26 se presentan en las Tablas 10 y 11 en Anexos.

6.5 Curva de calibración bacteriana en caldo MLM (Absorbancia vs UFC/mL)

Se determinó la relación entre la concentración de UFC/mL y la absorbancia mediante la construcción de curvas de calibración a partir de los datos obtenidos con el espectrofotómetro. Para este procedimiento, se siguió la metodología descrita en el acápite 5.6.

En la Figura 38 en Anexos, se presenta el conteo de colonias en la dilución 10^{-5}, realizado 24 horas después de la siembra. Aunque inicialmente se sembraron las tres últimas diluciones (10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5}), en las dos primeras no se obtuvo un conteo bacteriano adecuado, lo cual atribuye a una alta densidad celular, lo que imposibilitó el conteo de colonias, ya que a medida que la dilución aumenta, la cantidad de bacterias en la muestra disminuye, lo que reduce el número de colonias visibles en las placas de cultivo (Educación Científica, 2022).

Para estimar el número de colonias, se tomaron en cuenta las características morfológicas descritas por Nepita (2020) en la Figura 39 en Anexos, especialmente el tamaño y la forma de las colonias. Con base en esta observación, se estimó el número de colonias en 62.

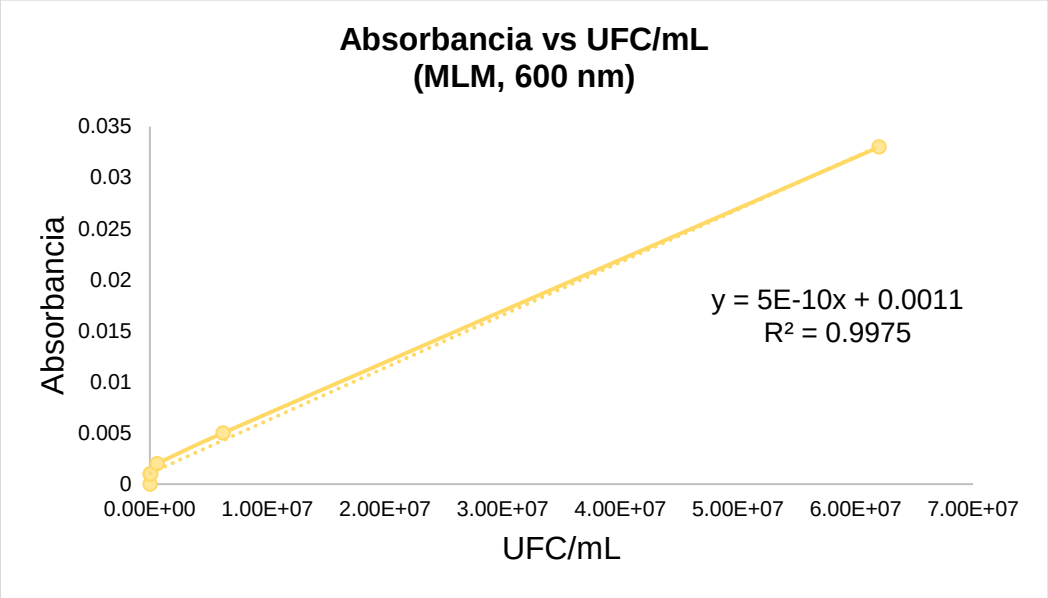
La determinación de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) se realizó utilizando la Ecuación 1, obteniendo un valor de 6.2×10^7 UFC/mL para la dilución original (10). Dado que la dilución 10^{-1} era 10 veces menos concentrada, se determinó que su concentración era de 6.2×10^6 UFC/mL. Este procedimiento se repitió para el resto de las diluciones.

Asimismo, se midió la absorbancia de las diluciones seriadas a una longitud de onda de 600 nm, empleando solución salina como blanco. Esta longitud de onda se seleccionó debido a que el medio de cultivo presenta una absorción mínima, lo que garantiza mayor precisión en las mediciones.

En la Figura 27, se muestra la curva de calibración bacteriana a partir de los valores de UFC/mL y absorbancia obtenidos en este análisis. Esta curva permitirá estimar la concentración bacteriana de *Serratia marcescens* en presencia de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D, a partir de futuras mediciones de absorbancia.

Figura 27

Curva de calibración bacteriana Serratia marcescens



Fuente: Elaboración propia

Los valores de UFC/mL y absorbancia utilizados para la construcción de la Figura 27 se presentan en la Tabla 12 en Anexos.

6.6 Evaluación del crecimiento de *Serratia marcescens* en presencia de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone como fuentes de carbono

En la Tabla 5 se muestran los valores de absorbancia y las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) obtenidas a lo largo de 24 horas de crecimiento para cada uno de los tratamientos evaluados. Los datos registrados fueron procesados a través de la curva de calibración bacteriana, lo que permitió estimar el crecimiento de la cepa *Serratia marcescens* en presencia de los plaguicidas seleccionados.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se estimó la concentración bacteriana (UFC/mL) de *Serratia marcescens* en presencia de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D a las concentraciones seleccionadas, mediante la relación absorbancia vs concentración mostrada en la Figura 27.

Tabla 5

Absorbancia y UFC/mL de Serratia marcescens en presencia de Gramoxone y 2,4-D

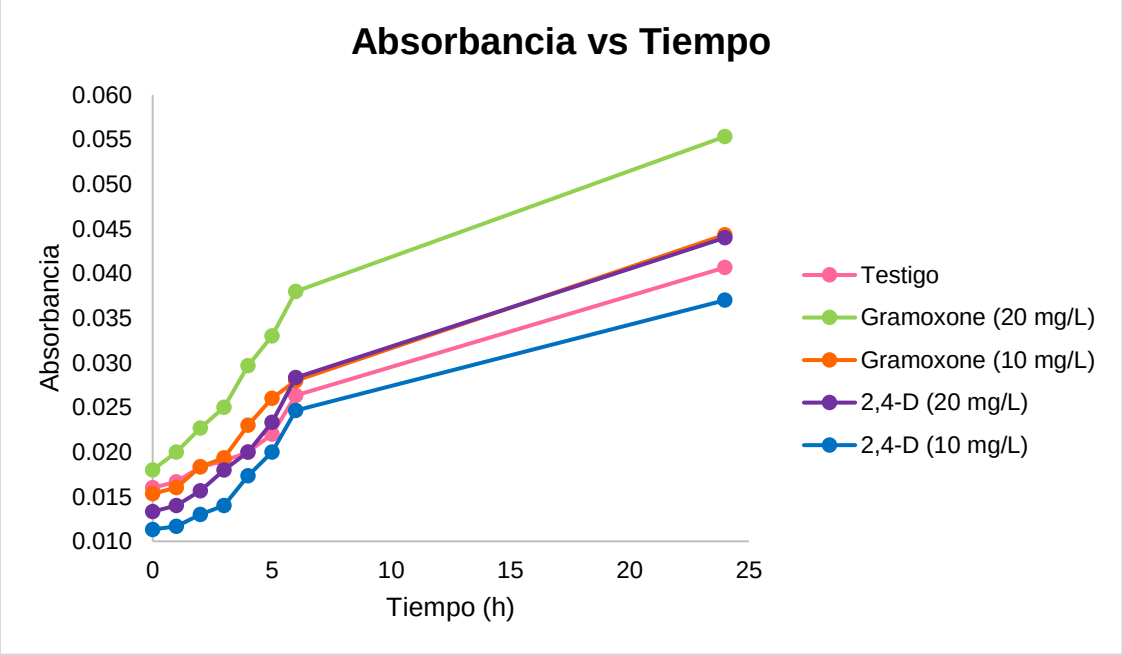
Tiempo (h)	Testigo		Gramoxone (20 mg/L)		Gramoxone (10 mg/L)		2,4-D (20 mg/L)		2,4-D (10 mg/L)	
	Abs.	UFC/ mL	Abs.	UFC/ mL	Abs.	UFC/ mL	Abs.	UFC/ mL	Abs.	UFC/ mL
0	0.016	2.98E7	0.018	3.38E7	0.015	2.85E7	0.013	2.45E7	0.011	2.05E7
1	0.017	3.11E7	0.020	3.78E7	0.016	2.98E7	0.014	2.58E7	0.012	2.11E7
2	0.018	3.45E7	0.023	4.31E7	0.018	3.45E7	0.016	2.91E7	0.013	2.38E7
3	0.019	3.58E7	0.025	4.78E7	0.019	3.65E7	0.018	3.38E7	0.014	2.58E7
4	0.020	3.78E7	0.030	5.71E7	0.023	4.38E7	0.020	3.78E7	0.017	3.25E7
5	0.022	4.18E7	0.033	6.38E7	0.026	4.98E7	0.023	4.45E7	0.020	3.78E7
6	0.026	5.05E7	0.038	7.38E7	0.028	5.38E7	0.028	5.45E7	0.025	4.71E7
24	0.041	7.91E7	0.055	1.08E8	0.044	8.65E7	0.042	8.58E7	0.037	7.18E7

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 28 se muestra el gráfico que relaciona la absorbancia con el tiempo para las cuatro muestras analizadas y el testigo. Todas las curvas mostraron un comportamiento sigmoideo típico de crecimiento bacteriano y que corresponde a los descrito por Gómez y otros (2018).

Figura 28

Relación entre la absorbancia y tiempo (h) a 600 nm

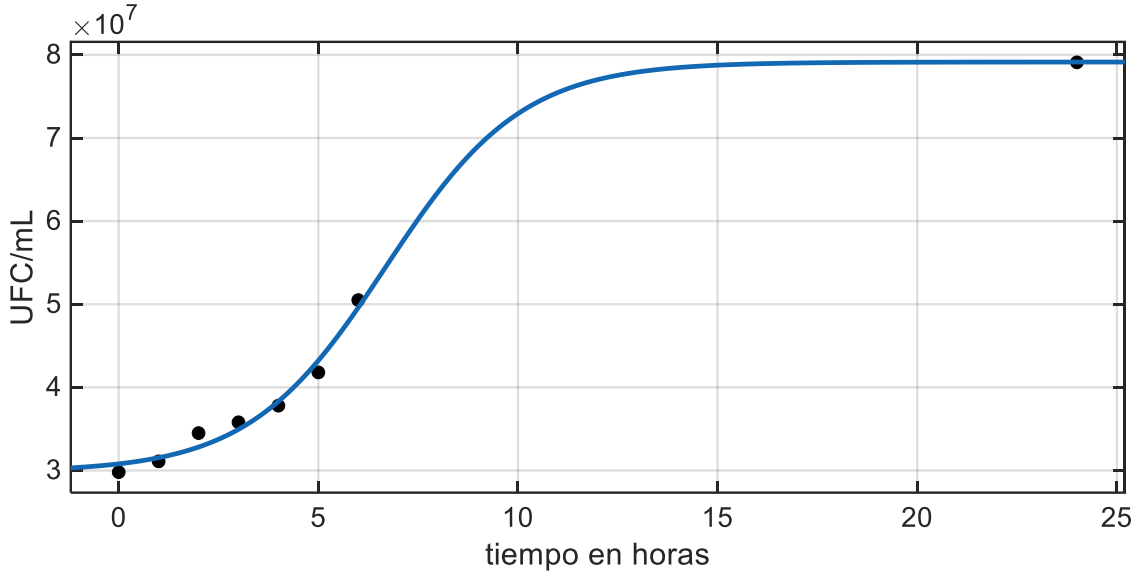


Fuente: Elaboración propia

Los valores de UFC/mL en función del tiempo fueron graficados tanto para el testigo como para cada concentración de los plaguicidas, y se presentan en las Figuras 29 a 33.

Figura 29

Curva de crecimiento de S. marcescens (testigo)



Fuente: Elaboración propia

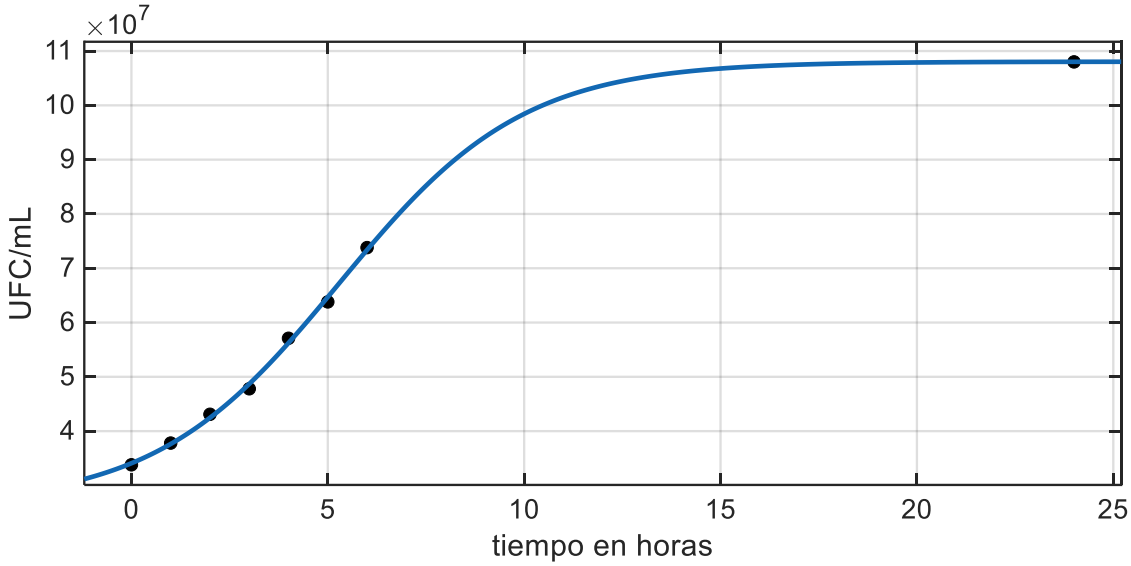
En la Figura 29 se observa el comportamiento de la cepa en el MLM sin plaguicida (testigo). La curva muestra un incremento de la biomasa, pasando de 2.98 x 10^7 UFC/mL a 7.91 x 10^7 UFC/mL en un período de 24 horas, lo cual indica un crecimiento favorable.

El ajuste del modelo logístico muestra una biomasa inicial (X_0) de 2.983 x 10^7 UFC/mL, un incremento neto de biomasa (ΔX) de 4.931 x 10^7 UFC/mL, una tasa de crecimiento (μ) de 0.5847 h^{-1} y un tiempo de crecimiento exponencial (t_{exp}) de 6.687 h. Estos resultados confirman que el medio líquido mínimo (MLM) proporciona condiciones adecuadas para el desarrollo bacteriano, permitiendo un crecimiento gradual sin la interferencia de otros compuestos en el medio. Por ello, este comportamiento se considera como referencia para interpretar el efecto de los plaguicidas sobre el crecimiento de la cepa.

En la Figura 30 (Gramoxone a 20 mg/L), se mostró un crecimiento final de biomasa superior al testigo (X_{max} = 1.089 x 10^8 UFC/mL), con una biomasa inicial (X_0) de 2.637 x 10^8 UFC/mL una tasa de crecimiento μ de 0.4274 h^{-1}, un tiempo exponencial, t_{exp}, de 5.288 horas y un incremento de biomasa, ΔX, de 8.168 x 10^7 UFC/mL. Aunque la μ fue menor que en el testigo, el hecho de que la biomasa final haya sido mayor y el tiempo exponencial más corto indica que la bacteria no solo toleró el Gramoxone, sino que logró crecer eficientemente y de forma más rápida en su presencia.

Figura 30

Curva de crecimiento de S. marcescens en presencia de Gramoxone (20 mg/L)

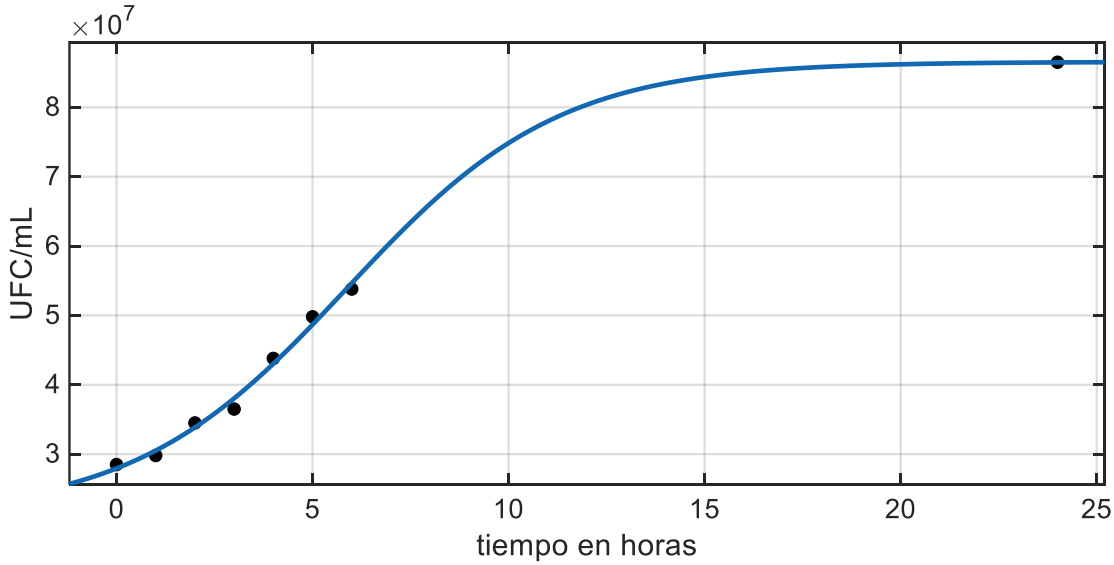


Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, en la Figura 31, que representa la curva para Gramoxone a 10 mg/L, la biomasa final fue menor que a 20 mg/L, pero aún superior al testigo (X_{max} = 8.65 x 10^7 UFC/mL). Los parámetros logísticos obtenidos fueron X_0 = 2.123 x 10^7 UFC/mL, ΔX = 6.532 x 10^7 UFC/mL, μ=0.3689 h^{-1} y t_{exp} = 5.874 h. Aunque μ fue inferior tanto al testigo como al tratamiento con 20 mg/L, el menor tiempo exponencial indica que la bacteria inició más rápido la fase de crecimiento activo, lo que sugiere una adaptación inicial positiva en presencia del plaguicida.

Figura 31

Curva de crecimiento de S. marcescens en presencia Gramoxone (10 mg/L)

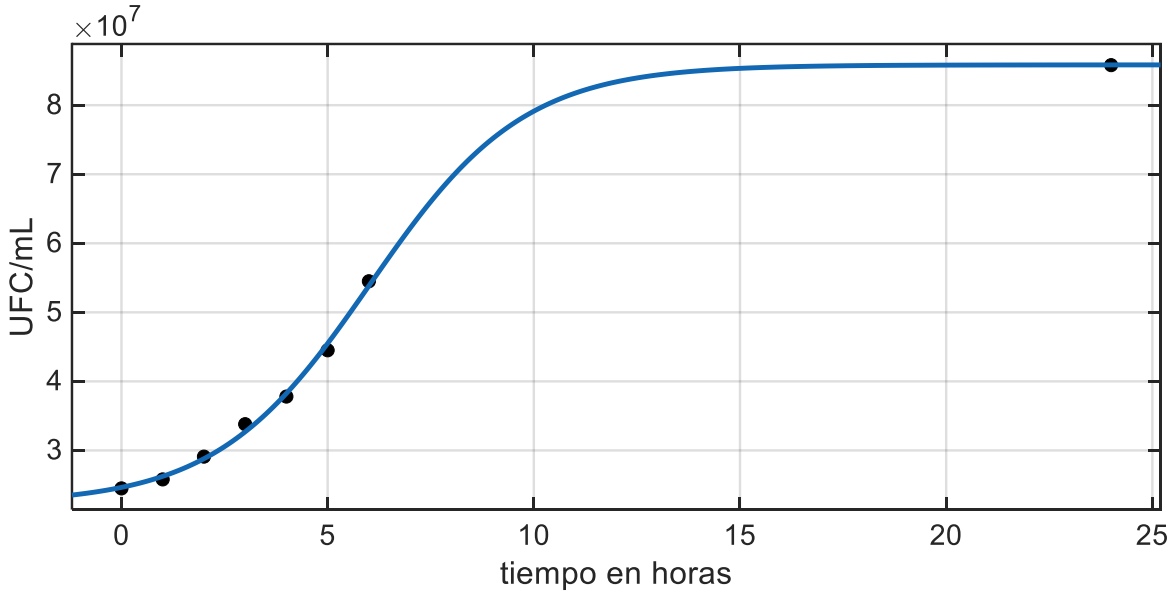


Fuente: Elaboración propia

Para el caso del 2,4-D a 20 mg/L, la Figura 32 muestra una cinética de crecimiento sostenida, alcanzando 8.58 x 10^7 UFC/mL. Ajustando la logística, se obtuvo X_0 = 2.225 x 10^7 UFC/mL, ΔX = 6.359 x 10^7 UFC/mL, μ=0.5378 h^{-1} y t_{exp} = 6.026 h. Al comparar estos valores con los del testigo, se observa que la máxima velocidad de crecimiento se alcanzó en menos tiempo; sin embargo, la tasa de crecimiento fue ligeramente menor. Esto sugiere que, aunque la adaptación del microorganismo no fue afectada significativamente, su rendimiento fue algo más limitado en términos de velocidad de crecimiento.

Figura 32

Curva de crecimiento de S. marcescens en presencia de 2,4-D (20 mg/L)

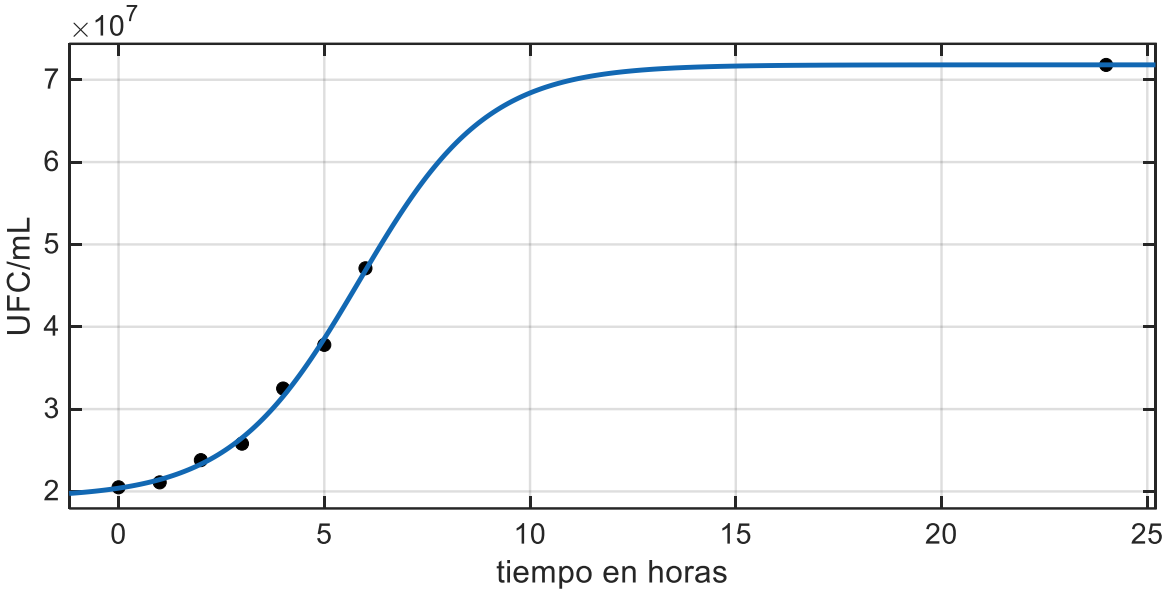


Fuente: Elaboración propia

En la Figura 33 (2,4-D a 10 mg/L), se observa un leve descenso en la biomasa final (7.18 × 10^7 UFC/mL), similar al patrón observado con Gramoxone a la misma concentración. Los parámetros logísticos obtenidos fueron: X_0 = 1.918 x 10^7 UFC/mL, ΔX = 5.263 x 10^7 UFC/mL, μ=0.6415 h^{-1} y t_{exp} = 5.841 h. Al comparar estos valores tanto con el testigo como con el tratamiento a 20 mg/L, se observa que, aunque la biomasa final fue menor, la tasa de crecimiento fue más alta y el tiempo para alcanzar la fase exponencial fue más corto. Esta combinación sugiere que la bacteria presentó una adaptación más rápida y eficiente en términos cinéticos, manteniendo su capacidad de desarrollo e incluso mejorando su rendimiento de crecimiento frente a estas condiciones, a pesar de no alcanzar la biomasa más elevada.

Figura 33

Curva de crecimiento de S. marcescens en presencia de 2,4-D (10 mg/L)



Fuente: Elaboración propia

En resumen, *Serratia marcescens* mostró una buena capacidad de adaptación frente a ambos plaguicidas. El mejor comportamiento general se observó con Gramoxone a 20 mg/L, donde se alcanzó la biomasa más alta y un inicio rápido del crecimiento, mientras que la mayor tasa de crecimiento se registró con 2,4-D a 10 mg/L, lo que indica una respuesta positiva en términos cinéticos. A pesar de las diferencias entre tratamientos, la cepa conservó una cinética de crecimiento cercana a la del testigo, estos resultados destacan el potencial de esta cepa para sobrevivir y crecer activamente en ambientes contaminados con distintos tipos y concentraciones de plaguicidas, posicionándola como una opción prometedora para procesos de biodegradación.

En la Tabla 13 en Anexos, se resumen los parámetros logísticos obtenidos para cada tratamiento, así como para el testigo.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) en el software Excel para evaluar si la cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* se ve o no afectada por la concentración de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone.

Teniendo en consideración los valores de la Tabla 5 y un nivel de significancia (α) del 5%, se determinó el valor p y el valor crítico; siendo menores a α y F_c, aceptando así la hipótesis nula. Por lo tanto, la cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* no se ve afectada por la concentración de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone, lo que se ve reflejado en que tres de las cuatro concentraciones (Gramoxone 20 mg/L, Gramoxone 10 mg/L, 2,4-D 20 mg/L) reportaron mayores valores de UFC/mL y X_{max}; además de t_{exp} más cortos que el testigo.

Los valores obtenidos a partir del análisis de varianza se resumen en las Tablas 14 y 15 en Anexos.

6.7 Cuantificación de la biodegradación de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D por *Serratia marcescens*

Mendoza y otros (2011) sugiere que la disminución de los valores de absorbancia a la longitud de onda seleccionada es un indicativo del porcentaje de biodegradación, ya que la bacteria utiliza los plaguicidas como única fuente de carbono, lo que reduce su concentración en el medio de cultivo y, en consecuencia, disminuye la absorbancia registrada.

De manera paralela a la cuantificación del crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría a 600 nm, se realizaron mediciones de absorbancia a 258 nm para el Gramoxone y a 229 nm para el 2,4-D, con el fin de evaluar el porcentaje de biodegradación de los plaguicidas por acción de *Serratia marcescens*.

En el análisis espectrofotométrico se consideró el pico de absorbancia característico de cada plaguicida como referencia para la cuantificación de su concentración, debido a que este pico es propio de la estructura molecular del compuesto y se ubica en una región distinta a la absorbancia que presenta la biomasa bacteriana, ya que según Obeso y Viplav (2023) esta suele manifestarse alrededor de 600 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos en este ensayo se resumen en las Tablas 6 y 7. A partir de las ecuaciones mostradas en las Figuras 25 y 26, se estimaron las concentraciones de Gramoxone y 2,4-D, respectivamente, en función de la absorbancia. Asimismo, el porcentaje de biodegradación de los plaguicidas fue calculado utilizando la Ecuación 3.

Tabla 6

Absorbancia, concentración de plaguicida y % de biodegradación de Serratia marcescens en presencia de Gramoxone

Hora	Gramoxone (20 mg/L)			Gramoxone (10 mg/L)		
	Abs.	Conc. (mg/L)	% Bdg	Abs.	Conc. (mg/L)	% Bdg
0	1.991	19.518	-	0.997	9.829	-
1	1.995	19.161	4.197	0.989	9.751	2.486
2	1.913	18.755	6.225	0.985	9.719	2.811
3	1.879	18.424	7.881	0.973	9.602	3.979
4	1.818	17.823	10.883	0.963	9.498	5.018
5	1.759	17.255	13.723	0.928	9.161	8.393
6	1.660	16.291	18.543	0.901	8.895	11.055
24	1.552	15.237	23.817	0.819	8.096	19.039

Fuente: Elaboración propia

Tabla 7

Absorbancia, concentración de plaguicida y % de biodegradación de Serratia marcescens por efecto de 2,4-D

Hora	2,4-D (20 mg/L)			2,4-D (10 mg/L)		
	Abs.	Conc. (mg/L)	% Bdg	Abs.	Conc. (mg/L)	% Bdg
0	2.432	18.696	-	1.315	9.905	-
1	2.416	18.570	7.151	1.304	9.816	1.844
2	2.279	17.487	12.566	1.300	9.787	2.132
3	2.121	16.244	18.782	1.262	9.488	5.122
4	1.970	15.058	24.709	1.205	9.037	9.633
5	1.909	14.578	27.109	1.162	8.698	13.016
6	1.857	14.167	29.167	1.101	8.224	17.763
24	1.790	13.639	31.803	0.996	7.392	26.077

Fuente: Elaboración propia

Tomando en cuenta lo planteado por Mendoza y otros (2011), y conforme a los valores presentados en las Tablas 6 y 7, *Serratia marcescens* logró biodegradar entre el 15 % y el 35 % de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D tras 24 horas de agitación. Se observó una mayor biodegradación en las muestras con concentraciones más elevadas (20 mg/L), alcanzando un 23.817 % para Gramoxone y un 31.803 % para 2,4-D. En las muestras con concentraciones menores (10 mg/L), se registraron porcentajes ligeramente inferiores: 19.039 % para Gramoxone y 26.077 % para 2,4-D.

En la Figura 34 se presenta la disminución de los valores de absorbancia mostrados en la Tabla 6 y Tabla 7 representados en función del tiempo para las muestras con Gramoxone y 2,4-D.

En la Figura 35, se presentan los valores de biodegradación correspondientes a la Tabla 6 y Tabla 7, representados en función del tiempo.

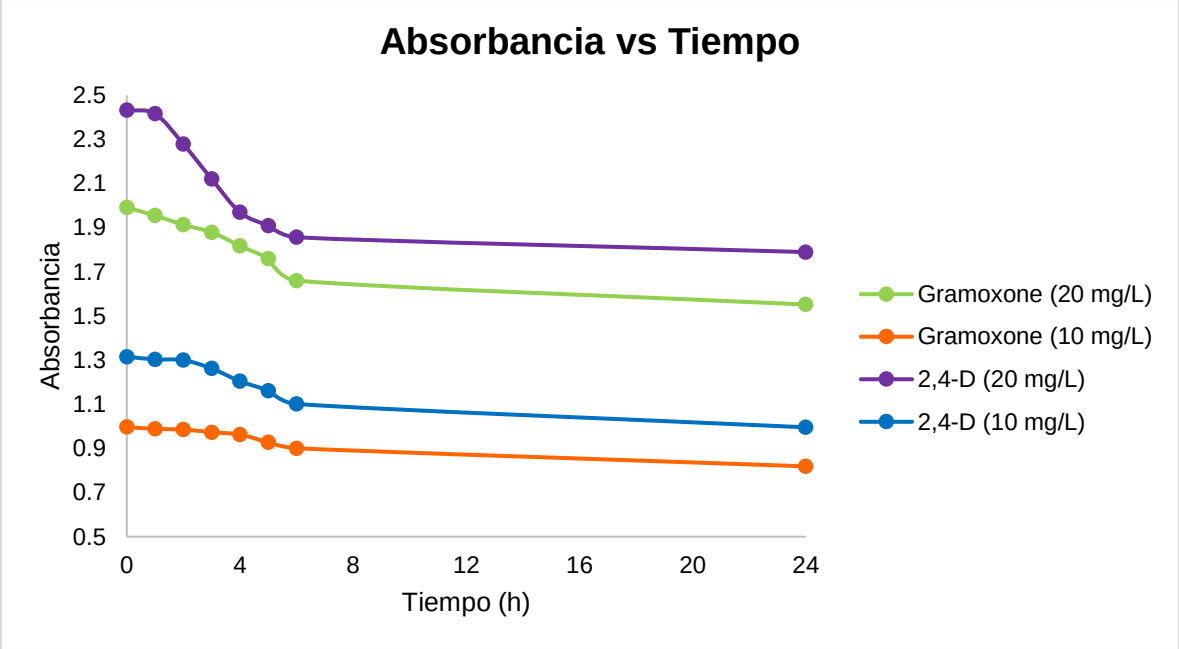
Los datos obtenidos en este apartado sugieren que los mayores porcentajes de biodegradación por acción de la bacteria *Serratia marcescens* se lograron con el plaguicida 2,4-D. Según Magnoli y otros (2020), esto se debe a que tanto la cadena lateral ácida del 2,4-D como su anillo aromático pueden ser degradados fácilmente por una amplia variedad de microorganismos, incluyendo a *Serratia marcescens*.

Por otro lado, el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Argentina (2021) señala que el plaguicida Gramoxone posee una estructura más compleja en comparación con el 2,4-D, principalmente debido a su principio activo, la bipiridina. Esta complejidad dificultó que la cepa *Serratia marcescens* transformara

completamente el principio activo, logrando solo una degradación parcial hacia metabolitos más simples que la molécula original (Magnoli y otros 2020).

Figura 34

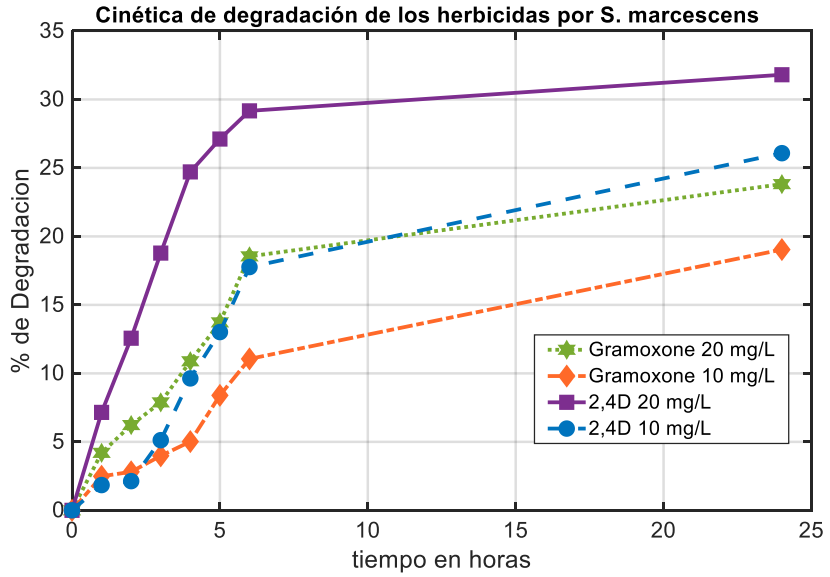
Reducción de absorbancia en función del tiempo para las muestras con Gramoxone y 2,4-D



Fuente: Elaboración propia

Figura 35

Porcentaje de biodegradación de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D en función del tiempo



Fuente: Elaboración propia

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) en el software Excel para evaluar si existe o no una biodegradación significativa de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone en presencia de *Serratia marcescens*.

Teniendo en consideración los valores de la Tabla 6 y 7, y un nivel de significancia (α) del 5%, se determinó el valor p y el valor crítico; siendo mayores a α y F_c, aceptando así la hipótesis alternativa. Por lo tanto, sí existe una biodegradación significativa de los plaguicidas 2,4-D y Gramoxone por efecto de *Serratia marcescens*, lo que se ve reflejado en que se obtuvieron valores de biodegradación del 15%-35%.

Los valores obtenidos a partir del análisis de varianza se resumen en las Tablas 16 y 17 en Anexos.

VII CONCLUSIONES

A partir del desarrollo de este estudio y del análisis de los resultados obtenidos, se han formulado las siguientes conclusiones:

Tras el proceso de caracterización morfológica de la cepa *Serratia marcescens*, se observaron colonias de color amarillo, con superficie convexa, textura brillante y bordes lobulados. La tinción de Gram permitió confirmar su clasificación como bacteria gramnegativa, al evidenciarse bacilos de color rojo bajo el microscopio. Estas observaciones respaldaron la identidad de la cepa y confirmaron su pureza y viabilidad.

Se logró determinar la concentración de células viables de *Serratia marcescens* mediante la construcción de una curva de calibración basada en la relación entre la absorbancia a 600 nm y las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). El procedimiento incluyó diluciones seriadas y recuento en placa, obteniéndose un valor representativo de 6.2×10^7 UFC/mL a partir de la dilución 10^{-5}, considerada la más adecuada para el conteo. Esta curva fue esencial para cuantificar el crecimiento bacteriano durante los ensayos y garantizar la homogeneidad en la cantidad de inóculo aplicado en cada caso.

Serratia marcescens mostró capacidad de crecimiento en presencia de los plaguicidas Gramoxone y 2,4-D, utilizándolos como fuente única de carbono. Se observó una adaptación eficiente en todos los tratamientos, con curvas logísticas que evidenciaron crecimiento sostenido en concentraciones de 10 mg/L y 20 mg/L. Los parámetros obtenidos (X_{max}, X_0, ΔX, μ y t_{exp}) indican que la bacteria mantiene su metabolismo activo incluso en presencia de compuestos potencialmente tóxicos, destacando una mayor tasa de crecimiento en 2,4-D a 10 mg/L.

A través de mediciones por espectrofotometría UV/Vis, se determinó que *Serratia marcescens* logró degradar entre el 15 % y el 35 % del 2,4-D y Gramoxone en un periodo de 24 horas bajo condiciones controladas de agitación. La mayor biodegradación se observó a 20 mg/L, alcanzando un 31.803 % para 2,4-D y 23.817 % para Gramoxone. Estos resultados demuestran el potencial de esta cepa para ser empleada en procesos de biorremediación de plaguicidas a nivel de laboratorio.

VIII RECOMENDACIONES

A partir de los hallazgos obtenidos en esta investigación y considerando aspectos que pueden enriquecer y ampliar futuros trabajos de investigación, se proponen las siguientes recomendaciones:

1. Incorporar técnicas analíticas avanzadas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación precisa de plaguicidas residuales, lo cual permitiría validar y complementar los resultados obtenidos por espectrofotometría UV/Vis.
2. Evaluar la adición de enzimas como alternativa cuando los microorganismos presenten limitaciones en la degradación completa de plaguicidas. La aplicación de enzimas podría acelerar el proceso y mejorar la eficiencia del tratamiento.
3. Ampliar el tiempo de incubación de los cultivos más allá de las 24 horas evaluadas en este estudio, con el objetivo de determinar si periodos prolongados permiten alcanzar mayores porcentajes de biodegradación.
4. Incluir un testigo bacteriano sin la presencia de plaguicidas durante las mediciones de biodegradación. Este control permitirá verificar que el crecimiento de la biomasa bacteriana no genera interferencias en las lecturas de absorbancia a longitudes de onda menores a 600 nm.
5. Considerando que la biorremediación de plaguicidas se ha desarrollado mayormente en condiciones de laboratorio, se recomienda diseñar ensayos en suelos reales, para simular condiciones ambientales más cercanas a la realidad y evaluar la viabilidad del proceso a escala piloto o de campo.

IX BIBLIOGRAFÍA

Aghaii, M., y Shetab, S. (2014). Extraction of Parquat from Blood by Clinoptilolite. *Advances in Toxicology*, 1-6.

Allen, M. (2016). *MacConkey Agar Plates Protocols.* American Society for Microbiology.

Benítez, P., y Contreras, M. (2013). Contaminación de aguas superficiales por residuos de plaguicidas en Venezuela y otros países de Latinoamérica. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 7-23.

Bikandi, J. (2014). *Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano.* Álava: Universidad del País Vasco.

Carvajal, A., Gómez, R., Mendoza, Y., y Amaya, A. (2023). Demostración práctica de la importancia de la longitud de onda en la espectroscopía Ultravioleta Visible. 40-49.

Castellanos, C., Velandia, J., González, M., Varela, D., y Ramírez, E. (2018). *Aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro UV-VIS UV-1800 de Shimadzu.* Colombia: Biblioteca Universidad EAN.

Castillo, A. (2022). *Espectrofotometría UV-vis para estimar la degradación de la furazolidona y sus efectos tóxicos en un sitio industrial.* Villahermosa: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Castillo, B., Ruíz, J., Manrique, M., y Pozo, C. (2020). Contaminación por plaguicidas agrícolas de cultivos en Cañete (Perú). *Espacios*.

Castillo, B., Ruiz, J., Manrique, M., y Pozo, C. (2020). Contaminación por plaguicidas agrícolas en los campos de cultivo de Cañete (Perú). *Espacios, 41*(10), 11.

CIRUMEDICS. (2023). *Medio de Cultivo Agar Sangre de Cordero Bio-Bacter.* Bogotá.

Clark, J. (2016). *The Beer-Lambert Law*. Obtenido de Chem guide: https://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/beerlambert.html

COPISA. (2021). *Identificación microbiana: métodos y su relevancia*. Obtenido de https://copisa.com.mx/identificacion-microbiana-relevancia/

Cruz, N., Sánchez, E., y Ortiz, L. (2014). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, 4*(1), 47-67.

Cuadra, J., y Vammen, K. (2010). Escurrimiento de Plaguicidas al Mar Caribe Nicaragüense - Establecimiento de un Sistema de Monitoreo Ambiental. *Universidad y Ciencia*, 27-32.

Dahal, P. (2023). Serratia marcescens- An Overview. *Microbe Notes*.

Delgado, H., y Fonseca, E. (2019). Bioprospección microbiana dirigida a identificar microbiologica y molecularmente microorganismos de utilidad agrícola e industrial en Nicaragua. *Universidad Nacional de Ingeniería*.

Department of Veterinary Disease Biology. (2011). Serratia marcescens. *Faculty of Health and Medical Sciences - University of Copenhagen*.

Díaz, C. (2011). *Capítulo 5. Caracterización Microbiológica.* Repositorio de la Universidad Nacional de La Plata.

DIFCO. (2009). *Chocolate Agar Placa de 90 mm.* Madrid.

Domínguez, J. M. (2020). Identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas en hortalizas de alto consumo comercializadas en mercados y supermercados de Managua. *Torreón Universitario*, 48-57.

Ebanks, B., Suárez, J., Siu, E., Montoya, J., Mairena, D., Flores, A., . . . Valencia, P. (2015). Concentración de plaguicidas en agua, sedimentos y ostiones (Crassostrea rizophorae) de la Laguna de Blueflields, RAAS, Nicaragua. *WANI*, 49-54.

Educación Científica. (2022). *Diluciones seriadas y siembra: enumeración microbiana*. Obtenido de https://app.jove.com/v/10507/serial-dilutions-and-plating-microbial-enumeration

Flores, V., y Fernández, E. (2016). *Protocolo Crioconservación de Cepas Bacterianas.* Instituto del Mar del Perú.

Food and Agriculture Organization. (2002). Términos y definiciones. *Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas*, 5-8.

García, E. (2009). *2° de Biología: Prácticas de Microbiología 2009-2010.* Universitat de les Illes Balears.

García, E., y Rodríguez, A. (1998). Alternativas técnicas para la eliminación de plaguicidas en el medio ambiente. *Dialnet*.

Gómez, A., Rosales, M., Lizardi, M., Treviño, G., Reyes, C., Castañón, H., y Barrales, H. (2018). Aislamiento e identificación de una cepa de serratia marcescens degradadora de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). *Agro Productividad, 11*(4), 118-123.

Guerrero, J., Ibarra, L., Balagurusamy, N., Frías, J., Hernández, L., y Carrillo, J. (2023). Microbiology and Biochemistry of Pesticides Biodegradation. *International Journal of Molecular Sciences*.

IEQFB. (2024). *Tipos de siembras microbiológicas*. Obtenido de Instituto Europeo de Química, Física y Biología: https://ieqfb.com/tipos-de-siembras-microbiologicas/

Jordán, M., y Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas .* La Serena: Universidad de La Serena.

Lezaun, J. (2023). Formulaciones de productos para la protección de cultivos, fitosanitarios o plaguicidas. *CropLife*.

López, D. (2024). *Análisis de la efectividad de producción de biosurfactantes por Pseudonomas aeruginosa como estrategia para la sostenibilidad ambiental.* Managua: Univerisidad Nacional de Ingeniería.

López, L. (2016). *Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes.* Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.

MacWilliams, M., y Liao, M. (01 de Diciembre de 2009). *Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses: Serratia marcescens*. Obtenido de https://asm.org/image-gallery/luria-broth-lb-and-luria-agar-la-media-and-th-13

Magnoli, K., Carranza, C., Eglé, M., Magnoli, C., y Barberis, C. (2020). Herbicides based on 2,4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 38501-38512.

McLaughlin, M., Pennock, D., y Rodríguez, E. (2019). *La contaminación del suelo: Una realidad oculta.* Roma: FAO.

Mendoza, J., Perea, Y., Salvador, J., Morales, J., y Pérez, G. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicida permetrina y cipermetrina en cultivo lote. *Avances en Ciencia e Ingeniería, 2*(3), 45-55.

Microbac. (2020). *Tipos de siembra*. Obtenido de https://www.labmicrobac.com/tipos-de-siembras/

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2014). *Aplicación eficiente de fitosanitarios.* Obtenido de https://www.manualfitosanitario.com/InfoNews/INTA%20Aplicacion%20eficiente%20de%20fitosanitarios%20Cap%202.%20%20Formulaciones.pdf

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina. (2021). *PARAQUAT: Efectos sobre la biota e impactos en la salud humana.* Buenos Aires: Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo.

Montana Goverment. (2023). *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid .*

Montgomery, D. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos Segunda Edición.* Ciudad de México: LIMUSA.

Nepita, A. (12 de Octubre de 2020). *Morfología colonial*. Obtenido de Microbiología: https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/

Obeso, S., y Viplav, A. (2023). Medición de OD600: 4 datos y consejos importantes para el crecimiento de cultivos bacterianos. *Conceptos básicos de Byonoy*.

Pérez, L., Valdivia, Y., y Torres, A. (2017). Aislamiento de Serratia marcescens en herida quirúrgica. *MediSur*, 538-544.

PROBIOTEK. (12 de Mayo de 2017). *CALDO LURIA (Luria Bertani LB)*. Obtenido de https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/caldo-luria-luria-bertani-lb/

Ruiz, F., Vaz, C., y Capparelli, L. (2006). Conducting Polymers as Sensor Materials for the Electrochemical Detection of Pesticides. *Sensor Letters*, 1-6.

Sanz, S. (2011). *Prácticas de microbiología* (Segunda ed.). Universidad de La rioja.

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2022). *Qué son los plaguicidas COP y su manejo adecuado*. Obtenido de residuoscop.org: https://www.residuoscop.org/movil/nota/que-son-los-plaguicidas-cop-y-su-manejo-adecuado

Silva, F. (2010). Serratia marcescens. *Revista Chilena de Infectología*, 209-210.

Silva, S., y Correa, F. (2009). Análisis de la contaminación del suelo. *Semestre Económico, 12*(23), 13-34.

Song, H., Liu, M., Mishra, S., Chen, S., Chang, C., Ghorab, M., . . . Chen, W. (2024). Microorganism-Driven 2,4-D Biodegradation: Current Status and Emerging Opportunities. *molecules*, 1-22.

Syngenta. (2021). *GRAMOXONE SUPER.* San Luis de Potosí.

Theory Labster. (2022). *Reactivos utilizados en la tinción de Gram*. Obtenido de Labster Theory: https://theory.labster.com/es/reagents/

Universidad de las Palmas Gran Canaria. (2005). Tinción de Gram. *Puebas Bioquímicas de Identificación Bacteiana*.

Wix Site. (2021). *Técnicas y tipos de sembrado en placa y tubo*. Obtenido de https://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/t-cnicas-y-tipos-de-sembrado

Yunga, A. (2021). *Resistencia de la Serratia marcescens a desinfectantes utilizados en ambientes hospitalarios.* Cuenca-Ecuador: Universidad Católica de Cuenca.

X ANEXOS

Figura 36

Autoclave YAMATO SQ810C utilizada durante el desarrollo del trabajo monográfico para la preparación de medios de cultivo y la esterilización de cristalería



Fuente: Elaboración propia

Figura 37

Incubadora microbiológica Thermo Scientific Heratherm utilizada para el cultivo de Serratia marcescens



Fuente: Elaboración propia

Figura 38

Microscopio Olympus BH-2 utilizado para la identificación morfológica del microorganismo mediante la tinción de Gram



Fuente: Elaboración propia

Figura 39

Espectrofotómetro Hatch DR 6000 utilizado para el escaneo del espectro UV/Vis y posterior medición de absorbancia



Fuente: Elaboración propia

Tabla 8

Espectro UV/Vis de Gramoxone (20 mg/L) en términos de longitud de onda (nm) y absorbancia

Gramoxone (20 mg/L)			
Longitud de onda (nm)	Absorbancia	Longitud de onda (nm)	Absorbancia
200	2.086	266	1.649
202	1.752	268	1.585
204	1.464	270	1.534
206	1.248	272	1.453
208	1.038	274	1.376
210	0.795	276	1.301
212	0.599	278	1.215
214	0.444	280	1.118
216	0.37	282	1
218	0.346	284	0.885
220	0.356	286	0.755
222	0.387	288	0.638
224	0.425	290	0.51
226	0.465	292	0.403
228	0.514	294	0.309
230	0.569	296	0.225
232	0.636	298	0.165
234	0.715	300	0.115
236	0.82	302	0.082
238	0.93	304	0.058
240	1.065	306	0.041
242	1.196	308	0.03
244	1.317	310	0.023
246	1.44	312	0.018
248	1.566	314	0.015
250	1.648	316	0.012
252	1.724	318	0.012
254	1.763	320	0.011
256	1.785	322	0.01
258	1.791	324	0.009
260	1.772	326	0.009
262	1.748	328	0.009
264	1.701	330	0.009

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9

Espectro UV/Vis de 2,4-D (20 mg/L) en términos de longitud de onda (nm) y absorbancia

2,4-D (20 mg/L)			
Longitud de onda (nm)	Absorbancia	Longitud de onda (nm)	Absorbancia
201	2.774	261	0.106
203	2.822	263	0.126
205	2.856	265	0.153
207	2.906	267	0.185
209	2.915	269	0.215
211	2.761	271	0.26
213	2.415	273	0.312
215	2.176	275	0.362
217	2.082	277	0.403
219	2.076	279	0.45
221	2.104	281	0.503
223	2.136	283	0.537
225	2.187	285	0.529
227	2.277	287	0.499
229	2.317	289	0.482
231	2.275	291	0.476
233	2.157	293	0.425
235	1.837	295	0.304
237	1.429	297	0.168
239	0.932	299	0.082
241	0.543	301	0.042
243	0.303	303	0.022
245	0.172	305	0.013
247	0.102	307	0.01
249	0.07	309	0.008
251	0.059	311	0.008
253	0.059	313	0.007
255	0.064	315	0.007
257	0.074	317	0.007
259	0.088	319	0.007

Fuente: Elaboración propia

Tabla 10

Valores de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de Gramoxone (258 nm, 10 mg/L)

Gramoxone (258 nm, 10 mg/L)				
Concentración (mg/L)	Abs. 1	Abs. 2	Asb. 3	Abs. Prom.
10	1.033	1.033	1.032	1.033
8	0.786	0.786	0.786	0.786
6	0.607	0.607	0.607	0.607
4	0.398	0.398	0.398	0.398
2	0.181	0.181	0.181	0.181
1	0.089	0.089	0.089	0.089
0.5	0.039	0.039	0.039	0.039
0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

Tabla 11

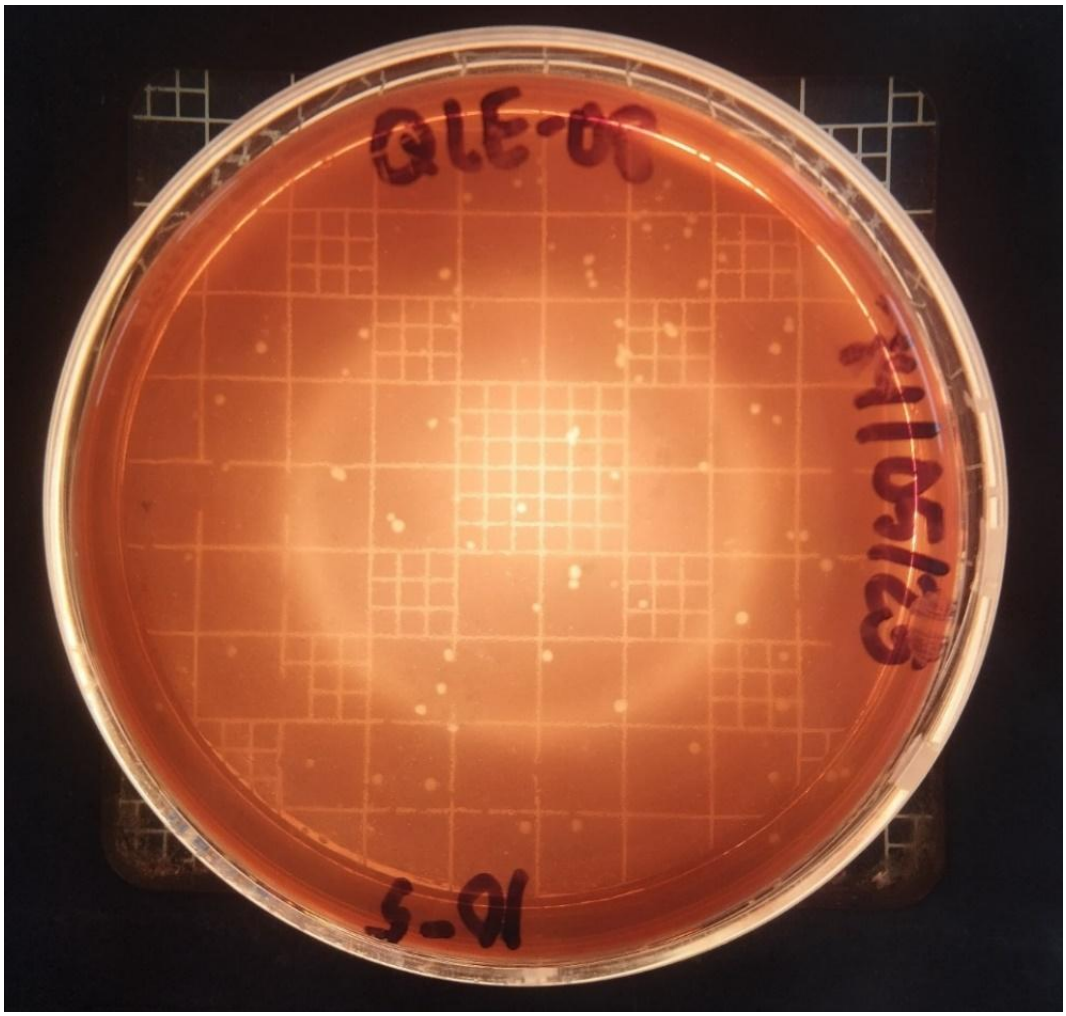
Valores de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de 2,4-D (229 nm, 10 mg/L)

2,4-D (229 nm, 10 mg/L)				
Concentración (mg/L)	Abs. 1	Abs. 2	Asb. 3	Abs. Prom.
10	1.346	1.346	1.346	1.346
8	1.043	1.043	1.043	1.043
6	0.8	0.801	0.8	0.800
4	0.575	0.575	0.575	0.575
2	0.363	0.363	0.363	0.363
1	0.187	0.187	0.187	0.187
0.5	0.138	0.138	0.138	0.138
0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

Figura 40

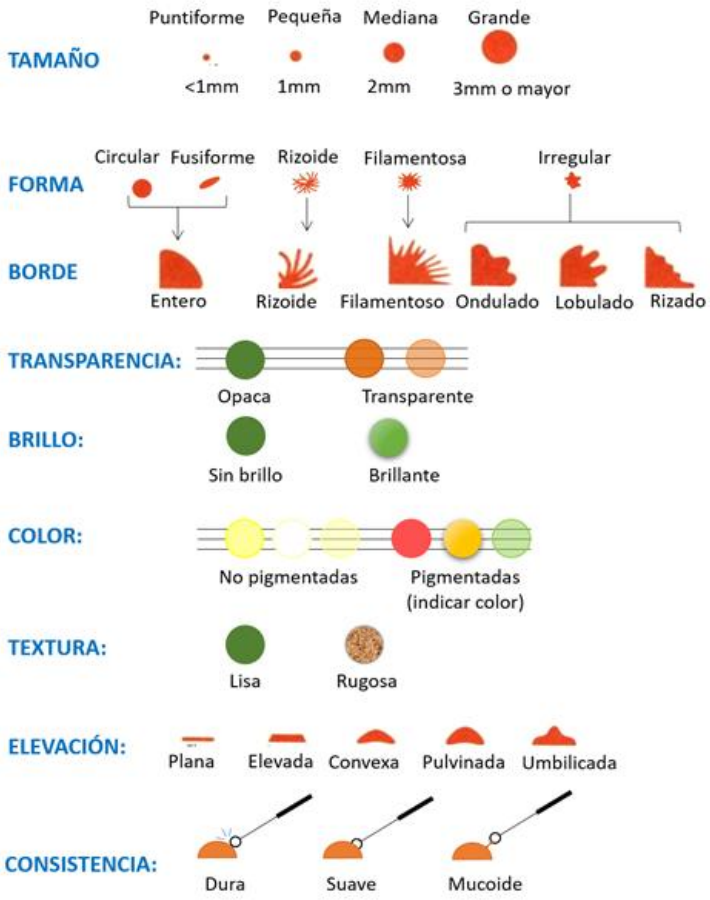
Conteo de colonias de la bacteria Serratia marcescens (dilución 10^{-5})



Fuente: Elaboración propia

Figura 41

Morfología bacteriana



Fuente: Elaboración propia

Tabla 12

Valores de UFC/mL y absorbancia para la construcción de la curva de calibración bacteriana

Dilución	UFC/mL	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Abs. Prom.
10^{-5}	$6.2*10^{2}$	0.001	0.001	0.001	0.001
10^{-4}	$6.2*10^{3}$	0.001	0.001	0.001	0.001
10^{-3}	$6.2*10^{4}$	0.001	0.001	0.001	0.001
10^{-2}	$6.2*10^{5}$	0.002	0.002	0.002	0.002
10^{-1}	$6.2*10^{6}$	0.005	0.005	0.005	0.005
1	$6.2*10^{7}$	0.033	0.033	0.033	0.033

Fuente: Elaboración propia

Tabla 13

Parámetros logísticos del testigo y los tratamientos

Parámetro	Testigo	Tratamientos			
		Gramoxone (20 mg/L)	Gramoxone (10 mg/L)	2,4-D (20 mg/L)	2,4-D (10 mg/L)
X_{max} (UFC/mL)	7.91E+7	1.089E+8	8.65E+7	8.58E+7	7.18E+7
X_0 (UFC/mL)	2.983E+7	2.637E+8	2.123E+7	2.225E+7	1.918E+7
ΔX (UFC/mL)	4.931E+7	8.168E+7	6.532E+7	6.359E+7	5.263E+7
μ (h^{-1})	0.5847	0.4274	0.3689	0.5378	0.6415
t_{exp} (h)	6.687	5.288	5.874	6.026	5.841

Fuente: Elaboración propia

Tabla 14

Resumen de los valores de suma, promedio y varianza de la primera hipótesis

	Gramoxone (20 mg/L)	Gramoxone (10 mg/L)	2,4-D (20 mg/L)	2,4-D (10 mg/L)
	3.38E+7	2.85E+7	2.45E+7	2.05E+7
	3.78E+7	2.98E+7	2.58E+7	2.11E+7
	4.31E+7	3.45E+7	2.91E+7	2.38E+7
	4.78E+7	3.65E+7	3.38E+7	2.58E+7
	5.71E+7	4.38E+7	3.78E+7	3.25E+7
	6.38E+7	4.98E+7	4.45E+7	3.78E+7
	7.38E+7	5.38E+7	5.45E+7	4.71E+7
	1.08E+8	8.65E+7	8.58E+7	7.18E+7
Σ	4.66E+8	3.63E+8	3.36E+8	2.80E+8
Promedio	5.82E+7	4.54E+7	4.20E+7	3.51E+7
Varianza (σ^2)	5.93E+14	3.58E+14	4.14E+14	3.04E+14

Fuente: Elaboración propia

Tabla 15

Análisis de varianza de la primer hipótesis

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.26E+15	3	7.54E+14	1.808	0.169	2.947
Dentro de los grupos	1.17E+16	28	4.17E+14			
Total	1.407E+16	31	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

Tabla 16

Resumen de los valores de suma, promedio y varianza de la segunda hipótesis

	Gramoxone (20 mg/L)	Gramoxone (10 mg/L)	2,4-D (20 mg/L)	2,4-D (10 mg/L)
	2.412	1.707	6.521	0.952
	4.197	2.486	7.151	1.844
	6.225	2.811	12.566	2.132
	7.881	3.979	18.782	5.122
	10.883	5.018	24.703	9.633
	13.723	8.393	27.109	13.016
	18.543	11.055	29.167	17.763
	23.817	19.039	31.803	26.077
Σ	87.681	54.488	157.802	76.539
Promedio	10.960	6.811	19.725	9.567
Varianza (σ^2)	54.450	34.576	99.846	80.079

Fuente: Elaboración propia

Tabla 17

Análisis de varianza de la segunda hipótesis

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	747.081	3	249.027	3.704	0.023	2.947
Dentro de los grupos	1882.661	28	67.238			
Total	2629.741	31	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia