

**ADAPTACIÓN DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO DE SUELOS EN EL LABORATORIO AMBIENTAL Y DE
ALIMENTOS NANCY FLÓREZ GARCÍA S.A.S.**

YINA MARCELA SOLANO PINTO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito

Para optar el título de

Microbióloga

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PAMPLONA NORTE DE SANTANDER
JUNIO 2016**

**ADAPTACIÓN DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO DE SUELOS EN EL LABORATORIO AMBIENTAL Y DE
ALIMENTOS NANCY FLÓREZ GARCÍA S.A.S.**

YINA MARCELA SOLANO PINTO

**TRABAJO DE PRÁCTICA EMPRESARIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA**

ASESORA:

VALERIA TRESPALACIOS MAESTRE

**MICROBIÓLOGA – LABORATORIO AMBIENTAL Y DE ALIMENTOS NANCY
FLOREZ GARCIA S.A.S**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA – NORTE DE SANTANDER
2016**

Nota de aceptación:

Firma del Primer Jurado

Firma del Segundo Jurado

DEDICATORIA

A mi hijo *Carlos Andrés Roys Solano* por ser la inspiración de todo lo que hago. A mi madre *María Pinto Pinedo* por su compañía y su gran apoyo durante la elaboración de este trabajo de grado. A mis hermanos *Edwin Solano, Luz Dari Pinto Y Yulis Pinto*, por creer en mí, por apoyarme durante este largo camino, por sus sacrificios su infinita paciencia y comprensión. A mi esposo *Jaime Luis Roys* por el apoyo en los momentos más difíciles y por infundirme paciencia cuando creí que esto no sería posible. Al microbiólogo *Andrés Ávila Mendoza*, por darme ejemplo de no desfallecer y luchar por lo que se quiere y por su apoyo incondicional. A *mis amigos y familiares* que me brindaron una sonrisa y sus palabras en el momento justo.

*Haz lo que amas y serás feliz. Es que hace lo que ama esta benditamente
condenado al éxito que llegara cuando deba llegar porque lo que debe ser será.*

Facundo Cabral

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le doy gracias a Dios por permitirme alcanzar este gran triunfo. A la Microbióloga *Loana Araujo Pumarejo* por permitirme realizar este trabajo de grado en el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S*, a la microbióloga *Valeria Trespalacios* por su colaboración y apoyo en esta grata experiencia, y por ultimo pero no menos importante a la universidad de Pamplona y al cuerpo de docentes que hacen parte del departamento de Microbiología, por su tiempo, dedicación y el gran conocimiento recibido por cada uno de ellos y ellas. Al Doctor *Francisco Rodríguez*, por su tiempo, colaboración y aportes como director del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| | pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <i>INTRODUCCIÓN</i> | 10 |
| 1. OBJETIVOS | 11 |
| 1.1. OBJETIVO GENERAL..... | 11 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 11 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 12 |
| 3. MARCO REFERENCIAL | 14 |
| 3.1. LABORATORIO AMBIENTAL Y DE ALIMENTOS NANCY FLÓREZ GARCÍA S.A.S, EN LA CIUDAD DE VALLEDUPAR DEL CESAR..... | 14 |
| 3.2. RECOPIACIÓN DE DOCUMENTOS..... | 14 |
| 3.3. MICROBIOLOGÍA DE SUELO..... | 14 |
| 3.4. IMPORTANCIA DE LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO..... | 15 |
| 3.4.1. Microorganismos del suelo..... | 15 |
| 3.4.2. Importancia de los microorganismos como indicadores de la calidad de suelos..... | 16 |
| 3.4.2.1. Indicadores microbiológicos y bioquímicos..... | 18 |
| 3.4.2.1.2. Bacterias:..... | 18 |
| 3.4.2.1.3. Hongos:..... | 18 |
| 3.5. DOCUMENTACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS..... | 19 |
| 3.5.1. Generalidades..... | 19 |
| 3.5.2. Fases en la elaboración de un procedimiento técnico..... | 19 |
| 3.6. NORMATIVIDADES EMPLEADAS PARA ELABORAR CADA UNO DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS..... | 24 |
| 3.6.1. Descripción de las referencias bibliográficas empleadas para la elaboración de los procedimientos técnicos..... | 25 |
| 3.6.1.1. ISO 10381-2:2002. Calidad del suelo - Toma de muestras - Parte 2: Orientación sobre las técnicas de muestreo..... | 25 |
| 3.6.1.2. Noma Técnica Colombiana. NTC 4113-4. Calidad de suelo. Muestreo. Parte 4. Guía sobre el procedimiento para la investigación de sitios naturales, semi-naturales y cultivados. | 26 |
| 3.6.1.3. EPA 821R04028. United States Environmental Protection Agency. Método 1682: Salmonella sp en los lodos de depuración (biosólidos) Modificado por semisólido empleando el medio Rappaport-Vassiliadis (MSRV)..... | 26 |
| 3.6.1.4. EPA [2006] Método 1680: Coliformes fecales en los biosólidos por procedimientos de fermentación en tubos múltiples..... | 26 |
| 3.6.1.5. ISO 14238:2012. La calidad del suelo - Los métodos biológicos - Determinación de la mineralización del nitrógeno y nitrificación en los suelos y la influencia de las sustancias químicas en estos procesos..... | 26 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.1.6. ISO 16072:2002: La calidad del suelo - Métodos de laboratorio para la determinación de la respiración del suelo microbiana..... | 27 |
| 4. METODOLOGÍA | 28 |
| 4.1. GENERALIDADES DE LA ELABORACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE SUELOS..... | 28 |
| 4.1.1. Elaboración del procedimiento técnico para la toma de muestra de suelo..... | 28 |
| 4.1.2. Elaboración del procedimiento técnico para la determinación de la Ausencia/Presencia de <i>Salmonella sp</i> , en muestras de suelo..... | 29 |
| 4.1.3. Elaboración del procedimiento técnico para el aislamiento y recuento de hongos totales de muestras de suelo..... | 29 |
| 4.1.4. Elaboración del procedimiento técnico para recuento de actinomicetos en muestra de suelo..... | 30 |
| 4.1.5. Elaboración del procedimiento técnico para la determinación coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en suelos..... | 31 |
| 4.2. CONTROL DE LA DOCUMENTACIÓN. | 31 |
| 5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES..... | 32 |
| 6. RESULTADOS..... | 33 |
| 6.1. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS REALIZADOS. | 33 |
| 6.1.1. Procedimiento para la toma de muestras de suelos destinados al análisis microbiológico..... | 34 |
| 6.1.2. Procedimiento técnico de ausencia/presencia de <i>salmonella spp</i> en muestras de suelo. | 35 |
| 6.1.3. Procedimiento técnico determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en suelos mediante NMP empleando el caldo LMX fluorocult..... | 36 |
| 6.1.4. Procedimiento técnico determinación y recuento de hongos totales en muestras de suelos mediante dilución en placa..... | 36 |
| 6.1.5. Procedimiento técnico determinación y recuento de actinomicetos mediante el método de dilución seriada a partir de muestras de suelo..... | 37 |
| 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 39 |
| 7.1. REVISIÓN BIOGRÁFICA. | 39 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 41 |
| 9. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS..... | 42 |
| 10. GLOSARIO..... | 43 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 45 |
| 12. ANEXOS..... | 50 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Tabla 1. Formato de un procedimiento técnico del Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S.</i> | <u>21</u> |
| <i>Tabla 2. Lista de diferentes referencias del método empleado para el análisis microbiológico en cada procedimiento técnico elaborado.</i> | <u>24</u> |
| <i>Tabla 3. Procedimientos técnicos elaborados destinados al análisis microbiológico de muestras de suelos.</i> | <u>33</u> |
| <i>Tabla 4. Composición del agar (ISO) semisólidos Rappaport Vassiliadis modificado.</i> | <u>35</u> |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Anexo 1. Procedimiento para la toma de muestras de suelos destinados a los análisis microbiológicos. PO-40</i> | 50 |
| <i>Anexo 2. Procedimiento técnico de ausencia/presencia de salmonella spp en muestras de suelo. PTM-48</i> | 50 |
| <i>Anexo 3. Procedimiento técnico determinación de coliformes totales y Escherichia coli en suelos mediante NMP empleando el caldo LMX fluorocult PTM-49</i> | 50 |
| <i>Anexo 4. Procedimiento técnico determinación y recuento de hongos totales en muestras de suelos mediante dilución en placa. PTM-47</i> | 50 |
| <i>Anexo 5. Procedimiento técnico determinación y recuento de actinomicetos mediante el método de dilución seriada a partir de muestras de suelo. PTM-50</i> | 50 |
| <i>Anexo 6. Formato de toma de muestra y transporte de muestras de suelos código RO-07.</i> | 50 |
| <i>Anexo 7. Formato de captura de datos para métodos cualitativos RO-116</i> | 50 |
| <i>Anexo 8. Formato de captura de datos para métodos del Número Más Probable NMP RO- 122</i> | 50 |
| <i>Anexo 9. Formato de captura de datos para la técnica de recuento en placa RO-115</i> | 50 |
| <i>Anexo 10. Instructivo de toma de muestra de suelo del complejo de laboratorios- bolsa de comercio del Rosario</i> | 50 |
| <i>Anexo 11. Clave dicotómica para identificación de los géneros aislados de muestras de suelo.....</i> | 50 |

INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados sobre la microbiología del suelo han aumentado gradualmente en los últimos años debido al rápido avance de la ciencia y el interés que ha surgido en indagar y caracterizar los suelos para su uso especialmente en el ámbito agrícola. En la actualidad, los laboratorios dedicados al análisis de muestras ambientales han buscado mejorar su competitividad implementando técnicas y mecanismos para análisis de toda muestra ambiental; entre ellas las muestras de suelo, entendiendo que estas requieren ciertas condiciones especiales desde su recolección in situ hasta el análisis dentro de condiciones controladas en el laboratorio.

Por lo anterior, el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flores García S.A.S*, para cumplir con sus objetivos de prestación de servicios y entregar al cliente resultados confiables y oportunos, tiene como finalidad establecer técnicas para analizar muestras de suelos la cuales se ajustan además de las necesidades y/o expectativas del cliente a las referencias normativas pertinentes para el análisis de muestras. Al hablarse de documentación de un método específico se debe establecer la información documentada que brinde soporte de lo que se desea implementar en la técnica a emplear, esto puede lograrse haciendo uso de artículos, textos y revistas científicas actualizadas necesaria para lograr tal finalidad.

Para garantizar el sistema de aseguramiento de la calidad, la documentación recopilada debe encontrarse actualizada y organizada, basándose en las especificaciones que reposan en la NTC-ISO-IEC 17025:2005; la cual contiene los requisitos que los laboratorios de ensayo y/o calibración deben cumplir para así demostrar que operan bajo un sistema de calidad, que son competentes en cuanto sus técnicas y personal que labora lo que conlleva a ser capaces de obtener resultados válidos y confiables generados por parte de los procesos realizados en el laboratorio.

Con base a lo anterior, el presente trabajo de grado busca documentar los procedimientos técnicos adecuados para el análisis microbiológico de suelos en el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García, S.A.S*, para así ajustarse a las necesidades de sus clientes, garantizando la emisión de resultados confiables, seguros y oportunos, comprometidos con la calidad del servicio, cultura de mejoramiento continuo y la protección del medio ambiente.

1. OBJETIVOS.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Diseñar los procedimientos técnicos destinados a la determinación de la calidad de muestra de suelo, mediante análisis microbiológicos, y la vez contribuir a la apertura del área de análisis de suelo en el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S.*

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar bases de datos, artículos y normatividades recientes, con el fin de elaborar los procedimientos técnicos de las pruebas microbiológicas que hacen parte del control de la calidad de muestras de suelos.
- Diseñar los procedimientos técnicos para el control de la calidad de muestras de suelos asociados con hongos (benéficos o patógenos de planta), y Actinomicetos.
- Elaborar los procedimientos técnicos para la determinación de la Ausencia/Presencia de *Enterobacterias (Salmonella spp y E.coli)* en muestras de suelos.

2. JUSTIFICACIÓN.

El suelo es un cuerpo natural que conforma el hábitat de bacterias, hongos, levaduras, virus y plantas superiores, entre otros, que sirve para la alimentación de los animales y del hombre a través de los ciclos tróficos.

Los microorganismos del suelo mantienen los sistemas ecológicos, ya que le aportan componentes químicos y minerales (como resultado de la biodegradación); y complejos orgánicos como ácidos húmicos y fúlvicos, enzimas, vitaminas, hormonas y antibióticos; además, albergan una rica reserva genética.

En la actualidad es lamentable ver como el suelo se encuentra seriamente amenazado por la práctica de sistemas de producción inadecuados o mal aplicados, que incluso han acelerado los procesos de erosión y desertificación de grandes zonas. Esto también se debe a la industrialización y urbanización ya que estas generan día a día una gran cantidad de desechos que son incorporados al suelo, lo cual ocasiona tanto la reducción de su fertilidad como la modificación de sus procesos naturales. Por lo anterior, es necesario estudiar las características particulares del suelo para determinar su grado de contaminación y consecuentemente, aplicar alguna de las tecnologías de remediación existentes. Por ende es muy común ver como en muchos países se emplean diferentes estrategias de restauración, las cuales tienen como consecuencia final el desencadenamiento de procesos de sucesión natural, que generan cambios importantes en las características físicas y químicas del suelo, en la composición de especies vegetales, animales y microbianas, variables que junto con el clima determinan la calidad del suelo (Kibblewhite *et al.*, 2008).

En este contexto los agricultores de la región necesitan conocer algunos indicadores de calidad del suelo para mejorar o no las condiciones nutricionales óptimas para siembras y cultivos, debido a que en esta matriz los microorganismos desempeñan funciones importantes para el ecosistema y se han mostrado como excelentes indicadores de su calidad. Además presentan la ventaja de ser más sensibles que los organismos superiores, como animales y plantas, debido a su tamaño y rápido crecimiento, por lo que son ideales para evaluar actividades de restauración en una escala de tiempo sucesional menor (Eaton y Chassot, 2012).

Debido a ello el *Laboratorio Nancy Flórez García S.A.S* busca elaborar una nueva área de análisis microbiológico, destinada al aislamiento y recuento de los microorganismos presentes en muestras de suelo. Para cumplir tal finalidad, como es el objetivo del presente trabajo de grado; se realizó una revisión bibliográfica haciendo uso de las bases de datos, revistas, artículos y demás documentación que aporte información sobre los procedimientos a seguir para lograr establecer una documentación que suministre información confiable, sobre los equipos, reactivos, medios, microorganismos y ejecución de pruebas y ensayos, que se deban implementar en un estudio microbiológico en suelo; minimizando así la posibilidad de error que se puedan generar durante las pruebas a realizar en el laboratorio. De esta manera el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S* podrá proveer a los agricultores de la región, clientes del laboratorio, una información

infalible y garantizada, sobre la calidad microbiológica de las muestras de suelo analizadas.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. LABORATORIO AMBIENTAL Y DE ALIMENTOS NANCY FLÓREZ GARCÍA S.A.S, EN LA CIUDAD DE VALLEDUPAR DEL CESAR.

El *Laboratorio Nancy Flórez García S.A.S* con NIT 824005588-0, inscrita en la cámara de comercio en la ciudad de Valledupar bajo el número 000270; cuenta con la prestación de servicios del Laboratorio Clínico y el Laboratorio Ambiental y de Alimentos; por medio de los cuales brinda a sus clientes procesos eficientes, controlados y asegurados mediante la certificación ISO 9001:2008, y el sistema de garantía de calidad analítica, que le permite entregar resultados confidenciales, confiables y oportunos.

El *Laboratorio Nancy Flórez García S.A.S* cuenta con programas de aseguramiento de la calidad con controles internos y externos, en las diferentes áreas de trabajo; buscando en primera instancia garantizar el cumplimiento de la normativa legal vigente y las normas ISO 9001:2008, ISO 17025:2005 e ISO 15189:2007, a través de su implementación, mantenimiento y mejora continua.

Adicionalmente, para el laboratorio Clínico en aquellos exámenes que tienen incidencia en el control epidemiológico se encuentra en una red con el control de calidad del Laboratorio Departamental de Salud Pública. Además este cuenta con laboratorios externos que le realizan controles de calidad inter-laboratorios.

3.2. RECOPIACIÓN DE DOCUMENTOS.

La recopilación documental es un instrumento o técnica de investigación social cuya finalidad es obtener datos e información a partir de documentos escritos y no escritos, susceptibles de ser utilizados dentro de los propósitos de una investigación en concreto (Báez, 2009). En este caso constituye una tarea ardua y laboriosa, ya que el estudio microbiológico del suelo a nivel nacional es algo nuevo y aun no se cuenta con algunas normatividades colombianas para estudio microbiológico de suelos, y por ende ha tocado adoptar normas internacionales que respalden este estudio, en el presente trabajo de grado (Cruz, 2012).

3.3. MICROBIOLOGÍA DE SUELO.

El suelo es uno de los hábitats más diversos de la tierra y contiene una gran diversidad de organismos vivos tales como bacterias, hongos, y actinomicetos (Coleman *et al.*, 2008). La biota del suelo juegan un papel vital en el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Wyatt, *et al.*, 2008). Recientemente, se ha venido profundizando más en el estudio microbiológico de los suelos, ya que con el paso de tiempo se ha visto la importancia que tienen los microorganismos en el suelo (Ben, *et al.*, 2011). Por ejemplo, Ge *et al.* (2008) informaron en un estudio realizado sobre los componentes

del suelo, que el sitio de muestreo tuvo un efecto mayor sobre la diversidad de la comunidad bacteriana del suelo que otras propiedades del suelo y la diversidad bacteriana diferían de la escala de muestreo. Sin embargo el estudio de las poblaciones microbianas que contiene el suelo en la región no tiene mucho auge, posiblemente por la falta de conocimiento sobre la importancia de estos en el suelo a nivel de agricultura. Es por ello que el *Laboratorio ambiental y de alimentos Nancy Flórez García, S.A.S*, ha visto la necesidad de general un campo especializado para el estudio de suelos a nivel microbiológico.

3.4. IMPORTANCIA DE LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO.

El conocimiento de la microbiología del suelo resulta esencial para comprender la agronomía y la ciencia ambiental. Sin la existencia de los microorganismos del suelo, la vida sobre el planeta no sería tal y como la conocemos hoy en día (Suzuki. 2009). Si estos seres no existieran, estaríamos rodeados de grandes cantidades de materia orgánica en descomposición. Es decir todo lo que hacemos está influido por los microorganismos y su actividad en la tierra.

El suelo es un cuerpo natural altamente dinámico y complejo en el cual la actividad microbiana juega un papel de suma importancia al incidir en sus propiedades. Las interacciones que se establecen entre plantas y microorganismos son claves para un adecuado establecimiento de sistemas de producción agrícolas, pecuarios y forestales. El generar conocimiento sobre la dinámica de estas interacciones en el suelo posibilita la adecuada utilización del recurso suelo y la utilización de muchos microorganismos del suelo con alto valor científico e investigativo. Actualmente se puede observar como una gran diversidad de los suelos del país exhiben algún grado de degradación, lo cual se puede evitar investigando en cómo los microorganismos mejoran las propiedades del suelo; para así establecer prácticas de manejo amigables con el ambiente en sistemas de producción sostenible.

El suelo constituye un sistema complejo que alberga una gran riqueza de microorganismos, los cuales establecen relaciones muy variadas y contribuyen a conformar las características propias del suelo, participan en los ciclos del carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales; aportan a la fertilidad del suelo y a la degradación de compuestos xenobióticos (cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre (Beauregard, *et al.*, 2010).

3.4.1. Microorganismos del suelo.

Los microorganismos edáficos se distribuyen en el suelo de manera no homogénea ocupando microhábitats producidos en los poros de las partículas del suelo. Por consiguiente, los resultados de los estudios de microbiología del suelo representan los

promedios de los efectos de los microorganismos que ocupan los diferentes microhábitats (Ibáñez, 2008).

La importancia de los microorganismos en ambientes naturales deriva de su cantidad, diversidad y, sobre todo, de su gran espectro de actividades que, en la mayoría de los casos, repercuten en los seres superiores con los cuales comparte un determinado hábitat. Concretamente en el suelo, los microorganismos desarrollan una amplia gama de acciones que inciden en el desarrollo y nutrición vegetal. Sin embargo, el nivel de actividad de las poblaciones microbianas de diversos suelos es muy bajo, salvo en el microhábitat donde haya una suficiente cantidad de fuente de carbono metabolizable (C-lábil). Cuando se introducen plantas en el sistema, la situación de los microbios cambia drásticamente, ya que las plantas son las principales suministradoras de sustratos energéticos al suelo, de los que los microorganismos se aprovechan cuando se encuentran en la zona próxima a la raíz y proliferan en ella (Tirado, 2010)

En este sentido dependiendo de la relación que exista entre las plantas y los microorganismos esto se dividen en tres grandes grupos:

- a) *saprotitos*, que utilizan compuestos orgánicos procedentes de residuos de animales, vegetales o microbianos.
- b) *parasíticos o "patógenos"*, causantes de enfermedades a las plantas.
- c) *simbiontes*, los cuales benefician el desarrollo y nutrición vegetal.

Entre los beneficios para el sistema suelo-planta, pueden citarse los siguientes:

- ✓ Estimulación de la germinación de las semillas y del enraizamiento.
- ✓ Incremento en el suministro y disponibilidad de nutrientes.
- ✓ Mejora de la estructura del suelo como consecuencia de la contribución microbiana en la formación de agregados estables.
- ✓ Protección de la planta frente a estrés hídrico y abiótico.

La fuente de dichos beneficios en general es atribuible a las colonias bacterianas y actinomicetos, relacionados con la mineralización del sustrato orgánico y procesos metabólicos y fisiológicos en la rizosfera (Martínez, *et al.* 2008).

3.4.2. Importancia de los microorganismos como indicadores de la calidad de suelos.

El suelo es probablemente el ambiente natural más rico en flora microbiana (actualmente denominada microbiota), pudiendo contener miles de millones de bacterias, hongos y Actinomicetos, por gramo de suelo. En el suelo se pueden encontrar una gran variedad de especies microbianas que le aportan beneficio convirtiéndolo en un suelo supresor de enfermedades, pero a la vez también se pueden encontrar especies que indiquen malas condiciones en cuanto a calidad de este, llegando a inducir enfermedades (Álvarez, 2008). Para dar una idea mucho más clara, se puede decir que los suelos se pueden clasificar de acuerdo a las funciones de

los microorganismos que lo habitan. Por ejemplo cuando se habla de suelos inductores de enfermedades, se hace referencia al tipo de suelo en el cual habitan los microorganismos patógenos de las plantas como lo es el hongo *Fusarium* spp, el cual puede comprender del 5 al 20% del total de la microflora del suelo; este género en combinación con un alto contenido de nitrógeno de la materia orgánica, puede satisfacer a los productos oxidados incompletamente se elevan como malos y tóxicos olores perjudicando así el crecimiento de las plantas. Además estos suelos tienden a causar infestaciones frecuentes de organismos de enfermedades, e insectos dañinos.

Los suelos que presentan la anterior característica generalmente tienden a tener pobres propiedades físicas, y amplias cantidades de energía son perdidas como invernadero. Este tipo de caso también afecta a los nutrientes de las plantas ya que estos son objeto de inmovilización en forma no disponible (Higa., et al., 2011).

Cuando se habla de suelos supresores de enfermedades; se hace referencia a los microorganismos antagonistas presentes usualmente en este tipo de suelo; estos microorganismos antagonistas son los responsables de producir abundantes cantidades de antibióticos. Estos incluyen hongos del genero *Penicillium* sp, *Trichoderma* spp, *Aspergillus* spp y Actinomicetos o del genero *Streptomyces*. Los antibióticos que producen pueden tener efectos bioestaticos y biocidas sobre las enfermedades de las plantas desarrolladas en el suelo.

Los cultivos plantados en estos suelos raramente pueden llegar a ser afectados por enfermedades o insectos plaga. Incluso si se aplica materia orgánica con alto contenido de nitrógeno, la producción de sustancias putrescibles es insignificante, y el suelo suele tener un olor agradable cuando esta materia orgánica se descompone (Higa., et al., 2011).

Las bacterias del suelo también juegan un papel fundamental en los procesos de reciclado de los materiales, ya que descomponen gran parte de los restos de seres vivos. Además influyen en muchos casos en la absorción de nutrientes por parte de las plantas y en otros aspectos beneficiosos para éstas. Al igual que los hongos los cuales pueden ser patógenos de plantas u otros pueden llegar a ser importantes al degradar compuestos orgánicos celulosa, lignina, pectina. Favorecen la estructura del suelo al unir partículas para formar agregados estables. De igual forma los Actinomicetos no se quedan atrás, ya que estos son capaces de degradar muchas sustancias complejas incluyendo celulosa, lignina y quitina. Son responsables del "olor a tierra" y ayudan a aumentar la estructura del suelo (Boff, 2008).

3.4.2.1. Indicadores microbiológicos y bioquímicos

3.4.2.1.2. Bacterias:

Expresa el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo. Es un indicador que refleja la población potencial de las bacterias en un determinado suelo, especialmente aquellas que ocupan diferentes nichos o habitan en forma saprofítica. La función básica de las bacterias es la descomposición y mineralización de los residuos orgánicos, de donde obtienen su fuente energética y alimenticia. Mediante su metabolismo liberan al medio sustancias como enzimas, proteínas, reguladores de crecimiento, metabolitos y algunos nutrientes. Los beneficios de las bacterias para los cultivos se relacionan con un incremento en la cantidad de raíces y un aporte importante de elementos básicos para el desarrollo y producción (Siddiqui & Akhtar, 2008).

El número de bacterias tiene una estrecha relación con algunas propiedades físicas del suelo, como la textura, estructura, porosidad, aireación y retención de humedad, ya que su actividad se beneficia con una mayor disponibilidad de oxígeno, principalmente en aquellos suelos con poca compactación y sin excesos de agua.

Dentro de las propiedades químicas que favorece la actividad de las bacterias se encuentra un pH cercano a la neutralidad, una baja acidez, altos contenidos de materia orgánica y alta disponibilidad de algunos elementos necesarios para su metabolismo, como N, Ca y Mg (Radjacommare *et al.* 2010).

También es importante tomar en cuenta los factores que pueden afectar negativamente las poblaciones de bacterias, dentro de éstos está la presencia de otros organismos antagónicos y de sustancias contaminantes en el suelo, así como la aplicación de agroquímicos.

3.4.2.1.3. Hongos:

La presencia de especies fúngicas en el suelo en gran escala, es un fuerte indicador de que esta matriz está en buenas condiciones en cuanto su calidad microbiológica, debido a que la función básica de los hongos es la descomposición y mineralización de los residuos orgánicos frescos o recién incorporados al suelo, por esto se les conoce como descomponedores primarios que mediante su metabolismo liberan gran cantidad de enzimas capaces de destruir compuestos de estructuras complejas, para así obtener su fuente energética y alimenticia. Además liberan al medio proteínas, reguladores de crecimiento, metabolitos y algunos nutrientes (Radjacommare *et al.* 2010).

Los beneficios de los hongos para los cultivos se relacionan con un incremento en la cantidad de raíces, una protección al ataque de fitopatógenos y un aporte importante de elementos básicos para el desarrollo y producción.

3.5. DOCUMENTACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS.

3.5.1. Generalidades.

Los procedimientos técnicos son documentos que tienen como finalidad normalizar las instrucciones de actuación evitando así las indefiniciones e improvisaciones que pueden producir problemas o deficiencias en la realización del trabajo.

Los procedimientos aseguran:

La realización de las actividades pueda ser ejecutada por cualquier analista del laboratorio en cualquier momento.

1. Desarrollar procedimientos de manera estandarizada, es decir, que estos sean realizados de la misma manera por todo el personal analista.
2. Dar cumplimiento al objetivo propuesto para la praxis del ensayo.

3.5.2. Fases en la elaboración de un procedimiento técnico.

La elaboración de un procedimiento se puede dividir en las siguientes fases:

- ✓ **Fase de Elaboración del borrador:** La persona designada para la elaboración de procedimiento, realiza un primer borrador del documento, que será la revisión 0.
- ✓ **Fase de Lanzamiento:** El borrador redactado en la fase anterior, se le da a conocer al gestor de calidad o a la persona encargada de la revisión del documento para que puedan sugerir modificaciones que mejoren la comprensión del procedimiento- La fase de lanzamiento finaliza con la redacción definitiva, en base al borrador y las sugerencias recibidas.
- ✓ **Fase de Aprobación:** Antes de su distribución, el documento debe ser aprobado por la persona responsable previamente asignada. Normalmente se designa a la Dirección o a la coordinación.
- ✓ **Fase de publicación:** Una vez aprobado, el documento debe ser publicado de forma controlada a las personas implicadas, conservando un registro de su publicación para asegurar que siempre se mantiene la última versión vigente.
- ✓ **Fase de Revisión:** La revisión de los documentos puede ser puesta en marcha tanto a solicitud de un empleado como de un cliente, para mejorar algún aspecto de los mismos.

En este caso, se seguirían las fases anteriormente expuestas (Prieto, Ruiz. 2008)

3.5.3 Forma de redactar un procedimiento técnico.

Es importante que los procedimientos sean escritos pensando en la persona a cargo de los análisis. Los detalles excesivos y el uso de terminología adecuada pueden

afectar adversamente la implementación, efectividad y eficacia del sistema de calidad. Los procedimientos mal diseñados son fuente común de frustraciones y pueden desprestigiar el proceso.

A continuación se ofrecen algunas recomendaciones generales para la redacción de los procedimientos técnicos:

- ✓ Evitar términos ambiguos.
- ✓ Escribir las frases en presente y en orden cronológico
- ✓ Ser exacto
- ✓ Plantear los objetivos que se pretende cubrir con el procedimiento y una vez redactado, comprobar que el documento los cumple.
- ✓ Utilizar diagramas de flujo, que permita obtener una visión global del procedimiento.
(Prieto, Ruiz. 2008)

3.5.4. Contenido mínimo de los procedimientos técnicos.

- ✓ Nombre del laboratorio
- ✓ Título del procedimiento.
- ✓ Aprobación y liberación del PO: fecha y firma de la persona que lo elabora, de quien lo revisa y del coordinador general del laboratorio, que sería quien lo apruebe.
- ✓ Numero de versión actual.
- ✓ Numero de documento
- ✓ Paginación: pagina actual /número de páginas totales.
- ✓ Alcance
- ✓ Número de copias
(Prieto, Ruiz. 2008)

Tabla 1. Formato de un procedimiento técnico del *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S.*

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|--|
|  | TÍTULO DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO | CODIGO | |
| | | VERSION | |
| | | FECHA | |
| | | Página 1 de 12 DOCUMENTO CONTROLADO | |

**RESPONSABLE DEL PROCESO:
COORDINADOR GENERAL DE LABORATORIO
COORDINADOR DE MICROBIOLOGIA
ANALISTA DE MICROBIOLOGIA**

| CONTROL DE CAMBIOS EN EL DOCUMENTO | | |
|------------------------------------|----------------------------|------------------|
| VERSION QUE CAMBIA | CAMBIOS REALIZADOS Y CAUSA | FECHA DEL CAMBIO |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

| AUTORIZACIONES | | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Elaborado por: | Revisado por: | Aprobado por: |
| Nombre / Cargo | Nombre / Cargo | Nombre / Cargo |
| Firma y Fecha: 2012/11/02 | Firma y Fecha: 2012/11/02 | Firma y Fecha: 2012/11/02 |

1. OBJETIVO

Indicar el fin que se desea alcanzar con la redacción del procedimiento.

2. ALCANCE

Describe las operaciones que abarca el procedimiento y las áreas de aplicación

3. FUNDAMENTO TECNICO

Marco o base teórico-prácticas que explican el procedimiento.

4. DEFINICIONES

Cuando sea necesario se deben definir términos técnicos, abreviaturas o palabras utilizadas en otros idiomas.

5. REFERENCIAS DEL METODO

Mencionar los documentos y normas (locales o internacionales) en las que se basa el procedimiento.

6. ATRIBUTOS DEL METODO

7. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Este ítem se refiere a las medidas dirigidas a reducir o eliminar los factores de riesgo, a los que pueden estar expuestos los analistas del laboratorio, así como ayuda a promover positivamente el medio ambiente.

8. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

Alteración o perturbación del desarrollo normal del OP mediante la interposición de otra que puede llegar a resultar un obstáculo.

9. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

9.1. EQUIPOS REQUERIDOS

Mencionar los equipos requeridos para el análisis.

9.2. REACTIVOS REQUERIDOS

Mencionar los reactivos a empelar durante el procedimiento.

9.3. MATERIAL DE REFERENCIA REQUERIDOS

Mencionar las cepas guías para la comparación del microorganismo aislado y así poder identificarlo.

9.4. MATERIALES REQUERIDOS

Mencionar los materiales necesarios para el análisis.

9.5. PROCEDIMIENTO

Conjunto de acciones u operaciones que tienen que realizarse de la misma forma, para obtener siempre el mismo resultado bajo las mismas circunstancias.

9.6. FLUJOGRAMA

Representación gráfica de un proceso; que contiene una breve descripción de las etapas de un proceso. Los símbolos gráficos del flujo del proceso están unidos entre sí con flechas que indican la dirección de flujo del proceso.

9.7. CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE RESULTADO

Determinación del significado de los resultados obtenidos luego de un análisis, al igual que se define que tan significativos son estos resultados en su contexto específico.

9.8. CONTROL DE CALIDAD

Estrategia para asegurar el cuidado y mejora continua en la calidad ofrecida, por parte del laboratorio, a su clientela y trabajadores.

9.9. CRITERIOS DE ACEPTACION O VALORES NORMALES DE REFERENCIA.

Material en el que los valores de una o más de sus propiedades están certificados por un procedimiento técnicamente validado, bien sea que este acompañado de, o pueda obtenerse, un certificado u otra documentación emitida por un ente certificador.

10. FORMATOS RELACIONADOS

Es un estándar que define la manera en que está codificada la información del análisis de una muestra, es decir es un documento que ayuda a archivar la información relacionada a un análisis relacionada con el laboratorio.

11. ANEXOS

Relaciona las tablas, gráficas, fotos y dibujos que complementa la información y el entendimiento del documento así como los formatos y los registros que soporten la ejecución del mismo.

3.6. NORMATIVIDADES EMPLEADAS PARA ELABORAR CADA UNO DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS.

Para la elaboración de los Procedimientos técnicos destinados al análisis de suelo en el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S*; se llevó a cabo una revisión minuciosa de las normas vigentes donde se establecen los requisitos necesarios, para análisis de suelo a nivel microbiológico. De igual manera se realizaron búsquedas de técnicas, EPAS (Agencia de Protección Ambiental) y metodologías como referencias para elaboración de los protocolos de los diferentes análisis microbiológicos plasmados en cada uno de los procedimientos técnicos elaborados.

Las referencias metodológicas tenidas en cuenta en la elaboración de los diferentes procedimientos técnicos, ver tabla N° 2.

Tabla 2. Lista de diferentes referencias del método empleado para el análisis microbiológico en cada procedimiento técnico elaborado.

| REFERENCIAS DE LOS MÉTODOS | METODOLOGÍA |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| ISO 10381-2:2002 Soil quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques | Toma de muestras de suelos. |
| NTC 4113-4. CALIDAD DE SUELO. MUESTREO. PARTE 4. GUIA SOBRE EL PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACION DE SITIOS NATURALES, SEMI-NATURALES Y CULTIVADOS. | |
| EPA 821R04028. United States Enviromental Protection Agency Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaportr-Vassiliadis (MSRV) Medium. | Determinación de <i>Salmonella</i> spp en suelos |

EPA [2006] Method 1680: Fecal Coliforms in Biosolids by Multiple-Tube Fermentation Procedures.

Determinación de coliformes totales y *E. coli* por el método de tubos múltiples sustrato enzimático (caldo fluorocult LMX).

Franco-Correa 2008. "Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de micorrizas" trabajo de Doctorado. ISO 14238:2012. Soil quality — Biological methods — Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes.

Aislamiento y Cuantificación de microorganismos Fijadores de Nitrógeno en Medio Ashby.(Actinomicetos)

Luis Carlos Fernández Linares Norma Gabriela Rojas Avelizapa. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados D. R. ©2006, Instituto Mexicano del Petróleo. ISO 16072:2002: Soil quality -- Laboratory methods for determination of microbial soil respiration

Determinación y recuento de hongos totales en muestra de suelo mediante dilución en placa.

3.6.1. Descripción de las referencias bibliográficas empleadas para la elaboración de los procedimientos técnicos.

Como se refleja en la tabla 2, para la elaboración del presente trabajo y por ende de los diferentes procedimientos diseñados, se citaron varias normatividades nacionales e internacionales, teniendo mayor acogida esta última, por disposición del laboratorio. A continuación se realizara una breve descripción de cada una de las normas citadas en el presente trabajo y en los protocolos diseñados.

3.6.1.1. ISO 10381-2:2002. Calidad del suelo - Toma de muestras - Parte 2: Orientación sobre las técnicas de muestreo.

Esta ISO (Organización Internacional de Estandarización) proporciona orientación sobre técnicas para la recogida y almacenamiento de muestras de suelo de manera que éstos posteriormente pueden ser examinados con el fin de proporcionar información sobre la calidad del suelo.

De igual forma esta brinda la información sobre el equipo típico que es aplicable en situaciones particulares de muestreo, permite que los procedimientos de muestreo que

deben llevarse a cabo sean los correctos, y las muestras recogidas sean representativas.

3.6.1.2. Norma Técnica Colombiana. NTC 4113-4. Calidad de suelo. Muestreo. Parte 4. Guía sobre el procedimiento para la investigación de sitios naturales, semi-naturales y cultivados.

Esta NTC, describe el muestreo de suelos de sitios naturales y semi-naturales, áreas para agricultura, horticultura, cultivos agrícolas especiales y bosques de madera. Contiene objetivos del muestreo, principios generales y toma de muestras de suelos disturbados.

3.6.1.3. EPA 821R04028. United States Environmental Protection Agency. Método 1682: *Salmonella* spp en los lodos de depuración (biosólidos) Modificado por semisólido empleando el medio Rappaport-Vassiliadis (MSRV).

Esta documentación proporciona detalladamente el procedimiento para el aislamiento de *Salmonella* spp de muestras de lodos, pero para el presente trabajo fue modificado y se aplicó la matriz suelo, en la cual igual que el procedimiento original se aislara *Salmonella* spp empleando el medio de enriquecimiento Rappaport-Vassiliadis (MSRV).

3.6.1.4. EPA [2006] Método 1680: Coliformes fecales en los biosólidos por procedimientos de fermentación en tubos múltiples.

Al igual que la anterior EPA, esta fue modificada al emplear el medio líquido LMX fluorocult (Merck), para así obtener los resultados en menor tiempo que en el método original. Esta modificación se realizó basándose en artículos científicos (Annarella, *et al.* 2008) en donde el autor emplea este método modificado, y obtiene resultados favorables. De igual forma no estuvo de más la revisión de la EPA original, donde se determinó que esta está sujeta a posibles modificaciones.

3.6.1.5. ISO 14238:2012. La calidad del suelo - Los métodos biológicos - Determinación de la mineralización del nitrógeno y nitrificación en los suelos y la influencia de las sustancias químicas en estos procesos.

Esta ISO brinda la información necesaria para la determinación de la calidad microbiológica de muestras de suelo. Proporciona información sobre los métodos biológicos que se pueden aplicar en el análisis y determinación de los microorganismos responsables de la mineralización de nitrógeno contenido en las formas orgánicas de amonio (amonificación) y, posteriormente, a nitrito y nitrato

(nitrificación). Y además explica el por qué cualquier interferencia a largo plazo con este proceso podría influir en la fertilidad del suelo.

3.6.1.6. ISO 16072:2002: La calidad del suelo - Métodos de laboratorio para la determinación de la respiración del suelo microbiana.

Este estándar describe métodos para la determinación de la respiración microbiana en suelos aeróbicos, insaturados. Los métodos son adecuados para la determinación de O₂ captado o CO₂ de liberado, ya sea después de la adición de un sustrato (respiración inducido por el sustrato), o sin la adición del sustrato (respiración basal).

La ISO 16702: 2002 es aplicable a la medición de la respiración del suelo con el fin de:

- Determinar la actividad microbiana en el suelo.
- Establecer el efecto de aditivos, contaminantes (nutrientes, mejoradores del suelo, etc.) sobre el rendimiento metabólico de los microorganismos;
- Determinar la biomasa microbiana.

4. METODOLOGÍA

Se realizó una revisión bibliográfica haciendo uso de bases de datos disponibles que brinden información confiable sobre el proceso y análisis de muestras de suelo. Igualmente se revisó las normas vigentes NTC-ISO-EPHA 14240-1: 1997, NTC-ISO-EPHA 16072:2011, para el total conocimiento de los parámetros y requisitos pertinentes en la documentación.

Para tal propósito se consideraron revistas virtuales actuales (2008-2016), tesis de grados y normas ISO (Organización Internacional para la Estandarización), relacionadas con el análisis microbiológico de suelo, (Lesschen, 2008) con el objetivo de ser utilizadas como referencia para la elaboración metodológica de los procedimientos técnicos destinados como guías para el estudio microbiológico de suelo, en el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S*

4.1. GENERALIDADES DE LA ELABORACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE SUELOS.

Con la finalidad de realizar cada uno de los procedimientos técnicos, para la determinación de los diferentes parámetros establecidos para el estudio de la calidad microbiológica de muestras de suelo, se analizó la documentación recopilada mediante una búsqueda virtual actualizada (2008-2016), teniendo en cuenta el fundamento de la técnica empleada, las condiciones de crecimiento, tales como los nutrientes necesarios en el medio de cultivo a utilizar, la temperatura óptima y el periodo de incubación que se debe tener en cuenta para cada uno de los microorganismos aislados de las muestras de suelo a analizar.

Además para la elaboración de cada uno de los procedimientos se tuvo en cuenta las pautas descritas en el numeral 3.5.4 del marco referencial

A todos los procedimientos técnicos se les asignó un código, para así facilitar su búsqueda en la página interna del laboratorio, esto con el fin de que los analistas del área tengan acceso directo a la información de una manera sencilla y eficaz.

4.1.1. Elaboración del procedimiento técnico para la toma de muestra de suelo.

El muestreo constituye la etapa inicial y fundamental para la adecuada interpretación de los resultados obtenidos en los laboratorios destinados al análisis de suelos. Sin embargo, debido a que el suelo es un material muy heterogéneo, con diferentes condiciones de origen, topografía, manejo, tipos de siembras, entre otras.; es necesario seguir un procedimiento adecuado y permitan realizar el muestreo adecuadamente.

Por tal motivo para la implementación de un procedimiento técnico estándar de como tomar las muestras de suelo destinadas al estudio microbiológico en el Laboratorio *Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S*, se procedió a leer cada uno de los documentos relacionados con la toma muestras de suelo, obtenidos como resultado de la búsqueda bibliográfica realizada con anterioridad y con base a las normatividades descritas anteriormente en el marco referencial, en los numerales 3.6.1.1. y 3.6.1.2., las cuales hacen referencia a las directrices para el diseño de los programas de muestreo, además de brindar la orientación sobre las técnicas de muestreo. Ambas tienen como finalidad principal la determinación de la calidad del suelo.

4.1.2. Elaboración del procedimiento técnico para la determinación de la Ausencia/Presencia de *Salmonella* spp, en muestras de suelo.

La presencia de Enterobacterias en suelo destinado a la agricultura, puede producir cambios sobre la microflora nativa de dicho suelo. La capacidad de resistencia a antimicrobianos que portan dichas bacterias puede ser transmitida a otras que no la poseen, las cuales pueden continuar con esta dispersión (Menéndez *et al.*, 2010) constituyendo un factor de riesgo ambiental y salud pública.

Debido a la importancia de la determinación de estos microorganismos como indicadores de malas prácticas agrícolas, se elaboró el procedimiento técnico estándar para la determinación de la Enterobacteria *Salmonella* spp. Basándose en la EPA 821R04028; descrito anteriormente en el numeral 3.6.1.3. Este método permite la detección y recuento de *Salmonella* spp (número de registro CAS 68583-35- 7) en los biosólidos tratados mediante el enriquecimiento, la selección y caracterización. Este método fue ajustado para el análisis microbiológico de suelos, basándose en artículos científicos, tesis de grado y demás documentos obtenidos de la revisión bibliográfica, realizada con anterioridad, donde los autores empleaban este método para el estudio de suelo en vez de biosólidos (Cooper, 2009).

Ademas se realizó una revisión bibliográfica donde se revisaron las siguientes revistas actualizadas tales como: Biology Journals, Sciencice Journals, Agris entre otras, encontradas en la base National Center for Biotechnology Information NCBI, empleando las siguientes palabras claves Enterobacterias en suelo, EPHA de *Salmonella* spp en suelo.

4.1.3. Elaboración del procedimiento técnico para el aislamiento y recuento de hongos totales de muestras de suelo.

Estos tipos de microorganismos son un gran potencial de degradación orgánica e indicadores de calidad microbiológica de suelos, donde desempeñan un papel fundamental, ya que como se mencionó anteriormente en el numeral 3.4.2.1.3; los hongos son uno de los microorganismos empleados para diagnosticar la calidad del suelo (muestras de suelo analizadas), ya que pueden producir las enzimas necesarias

para la degradación de la materia orgánica, compuesta en general por diferentes compuestos complejos (almidón, celulosa, pectina, etc) en compuestos simples (glucosa, por ejemplo), al igual también son responsables de la formación de humus o amantillos; en pocas palabras los hongos son uno de los precursores de la fertilidad del suelo (Rosa *et al*, 2008)

Por lo anterior se ha visto la necesidad de elaborar un procedimiento técnico sobre el aislamiento y recuento de hongos totales en el laboratorio, ya que la evaluación y control de la calidad en muestras de suelo que contengan estos microorganismos debe ser indispensables, puesto que estos como indicador de calidad juega un papel de gran importancia en cuanto la determinación de las condiciones del suelo a nivel microbiológico.

Para realizar este procedimiento se consultaron las normatividades descrita en el numeral 3.6.1.5 que respaldan este tipo de estudio en suelo, las bases de datos que contienen información sobre índices de biodiversidad fúngica, presentes en suelo; además de ello se tuvo en cuenta las revistas científicas actualizadas expuesta en NCBI.

4.1.4. Elaboración del procedimiento técnico para recuento de actinomicetos en muestra de suelo.

Los actinomicetos, son microorganismos del suelo caracterizados por ser organismos intermedios entre los hongos y las bacterias. Tienen aspecto filamentosos y, al igual que los hongos, la capacidad de segregar antibióticos (estreptomina, aureomicina, terramicina, cloromicetina y tetraciclina).

Por otro lado, como las bacterias, los actinomicetos realizan numerosas reacciones bioquímicas y participan en el proceso de formación de humus y en la alimentación de las plantas al mineralizar la materia orgánica. Algunas especies pueden fijar nitrógeno atmosférico en asociación con algunas especies de árboles. Su número en el suelo agrícola es elevado (un millón a cien millones por gramo de tierra). Su peso medio es de una tonelada por hectárea (Acuña. *et al*, 2014).

Sin duda los actinomicetos son de gran importancia para la disolución de la materia orgánica del suelo y la liberación de nutrientes de ella. Reducen a formas más sencillas los compuestos más resistentes, como la lignina. La capacidad de los actinomicetos de simplificar el humus es importante, especialmente respecto al nitrógeno. Considerables cantidades de este elemento parecen estar relacionadas con formas húmicas complejas y pueden quedar sin asimilar por las plantas superiores. Los actinomicetos tienen la habilidad de volver a poner estas sustancias en circulación, junto a los hongos y las bacterias, como agentes fertilizantes en el suelo cultivable. Como antagonistas microbianos los actinomicetos regulan la composición de la comunidad en el ecosistema del suelo, en parte porque excretan antibióticos y

enzimas de lisis, lo que tiene utilidad en el control biológico de insectos, nematodos y otros patógenos vegetales (Restrepo, *et al.*, 2014).

Debido a la importancia de los actinomicetos como seres nitrificantes en el suelo y por sus diversas funciones en este se elaboró el procedimiento técnico para la determinación de estos microorganismos en muestras de suelo.

Para la elaboración de este procedimiento se revisaron revistas actualizadas (2008 a 2016), las revistas citadas fueron Agris, ISI Web of Science, Ebooks Springer y ScienceDirect- Web Editions; donde para la realización de la búsqueda se emplearon palabras claves tales como: Actinomicetos en suelos, EPHA de determinación de actinomicetos en suelo.

4.1.5. Elaboración del procedimiento técnico para la determinación coliformes totales y *Escherichia coli* en suelos.

La presencia de este tipo de microorganismos en suelo, destinado a la agricultura, al igual que en el caso de *Salmonella* spp, exponen a cambios en cuanto a la calidad de los suelos dispuesto para la agricultura, y es un gran indicativo de que de que no se están aplicando las buenas practicas agrícola.

De igual manera y como se hizo en los procedimientos anteriores se optó por elaborar el procedimiento técnico estándar para la determinación de los *Coliformes totales* y *E. coli*. Para la elaboración de los procedimientos para la determinación de este tipo de enterobacteria se tuvo en cuenta las mismas revistas nombradas para el caso de *Salmonella* spp, empleando palabras claves como: Enterobacterias en suelos, EPHA para el aislamiento de Coliformes y *E. coli*,

4.2. CONTROL DE LA DOCUMENTACIÓN.

Una vez obtenida la documentación y, elaboración de la totalidad de los procedimientos técnico, se hizo entrega de estos, al área administrativa del laboratorio, donde se culminó con la aprobación de la microbióloga Loana Araujo Pumarejo coordinadora general del Laboratorio Ambiental y de alimentos Nancy Flórez García S.A.S. luego se publicó en la página principal del laboratorio cada uno de los procedimientos por parte de la persona encargada de gestión de calidad, Maria Francisca Aroca, para facilitar así el fácil acceso al personal que le compete.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

| |
|---------------------------|
| CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES |
|---------------------------|

FECHA INICIO DE PASANTIAS: 2016/02/08

COORDINADOR DEL PROYECTO: VALERIA TRESPALACIOS M / FRANCISCO RODRÍGUEZ R

| MES SEMANA ACTIVIDADES | FEBRERO | | | | MARZO | | | | ABRIL | | | | MAYO | | | | JUNIO | | | | JULIO | | | | AGOSTO | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------|---|---|---|-------|---|---|---|-------|---|---|---|------|---|---|---|-------|---|---|---|-------|---|---|---|--------|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Elección del tema | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Coordinación del trabajo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Búsqueda de las bases bibliográficas | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Presentación del proyecto al laboratorio | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Autorización en el laboratorio ambiental y de alimentos Nancy Flórez García S,A,S, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Análisis de la documentación obtenida de las bases de datos. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Elaboración de informe | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Presentación informe final a la universidad de Pamplona | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Comunicación de resultados en la empresa | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

6. RESULTADOS.

La documentación es una herramienta fundamental, necesaria para poder establecer pautas de trabajo, que garanticen la ejecución adecuada de los protocolos establecidos en el laboratorio. Lo cual se puede llegar a lograr realizando una revisión de normas, técnicas y procedimientos para así favorecer la confiabilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio.

Debido al interés del laboratorio de crecer en cuanto a sus áreas de análisis microbiológicos, se vio la necesidad de trabajar en la elaboración de nuevos procedimientos técnicos para ampliar el número de matrices a analizar en el área de microbiología. Se elaboró cinco procedimientos técnicos, para lo que se realizó una revisión bibliográfica minuciosa, con el propósito de obtener información confiable regida bajo normas, EPHA y métodos estandarizados, para así favorecer la confiabilidad y garantía de los resultados obtenidos.

6.1. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS REALIZADOS.

Dentro de los procedimientos realizados en el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S* se documentó 5 procedimientos técnicos. Para cada uno de ellos se diseñó el formato que está contemplado dentro del sistema de gestión con todos sus ítems requeridos para ser aprobado por la dirección.

Las pruebas se documentaron bajo este formato teniendo en cuenta la finalidad de cada una de estas, en la siguiente tabla se pueden observar cada título de los procedimientos técnicos con sus respectivos códigos elaborados con base en la documentación antes realizada sobre estudios microbiológicos de suelos.

Tabla 3. Procedimientos técnicos elaborados destinados al análisis microbiológico de muestras de suelos.

| TITULO DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO | CÓDIGO DEL DOCUMENTO |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Procedimiento para la toma de muestras de suelos destinados al análisis microbiológico. | PO-40 |
| Procedimiento técnico de ausencia/presencia de <i>salmonella</i> spp en muestras de suelo. | PTM-48 |
| Procedimiento técnico determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en suelos mediante NMP empleando el caldo LMX fluorocult | PTM-49 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Procedimiento técnico determinación y recuento de hongos totales en muestras de suelos mediante dilución en placa. | PTM-47 |
| Procedimiento técnico determinación y recuento de actinomicetos mediante el método de dilución seriada a partir de muestras de suelo. | PTM-50 |

6.1.1. Procedimiento para la toma de muestras de suelos destinados al análisis microbiológico.

Para la elaboración de este procedimiento se tuvo en cuenta el instructivo de toma de muestra de suelo del complejo de laboratorios- bolsa de comercio de rosario, el cual ayudo a determinar el material y herramientas a emplear, de igual manera también se tuvieron en cuenta tesis de grados relacionadas con el tema del estudio microbiológico del suelo. (Ver anexo 10)

Se realizó una breve fundamentación sobre la técnica a emplear para realizar la toma de muestra de suelo, en donde se tuvo en cuenta la ISO 10381-1:2007 la cual establece los principios generales que deben aplicarse en el diseño de programas de muestreo con el fin de caracterizar y controlar la calidad del suelo y la identificación de las fuentes y los efectos de la contaminación de este, y la ISO 10381-2:2002, esta ISO proporciona orientación sobre técnicas para la recogida y almacenamiento de muestras de suelo de manera que éstas posteriormente pueden ser examinados con el fin de proporcionar información sobre la calidad del suelo.

Luego se definieron los conceptos necesarios para la comprensión y realización del procedimiento.

En la descripción de actividades se expuso un listado de equipos e insumos necesarios para la realización del protocolo propuesto, se tuvo en cuenta la cantidad de muestra y la forma de recogida de la misma.

En el procedimiento se determinó paso a paso la metodología para la toma de muestra haciéndolo de forma descriptiva en cada paso y haciendo uso de un flujograma.

Para garantizar la custodia de la muestra se elaboró un formato para el registro de la llega de la muestra al laboratorio, en este formato este formato está dividido en las siguientes partes; un espacio para la identificación del cliente, datos de la muestra, análisis solicitado, relación de recipientes y preservación de acuerdo al ensayo y por último la recepción de la muestra en el laboratorio, donde se ubicó un espacio para asignar el código de la muestra, para las firmas de quien entrega la muestra, de quien la recibe y la firma de quien ingresa la muestra al software.

(Ver Procedimiento para la toma de muestras de suelos destinados al análisis microbiológico código PO-40. Anexo 1 Formato: toma de muestra y transporte de muestras de suelos código RO-07. Anexo 6)

6.1.2. Procedimiento técnico de ausencia/presencia de *salmonella* spp en muestras de suelo.

Para la elaboración de este procedimiento se recopiló toda la información necesaria, provenientes de base de datos y las revistas mencionadas anteriormente, tal información sirvió para determinar las condiciones óptimas para favorecer el crecimiento de este tipo de microorganismo, el medio de cultivo a emplear y la metodología. Se propuso como método para el aislamiento de *Salmonella* spp las diluciones seriadas empleando el medio de cultivo semisólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MSRV) (ISO) tabla 4; ya que este medio cumple con las exigencias en cuanto composición nutritiva, para el óptimo enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp de los alimentos, heces de animales y muestras ambientales de la etapa primaria de la producción animal. Este medio cumple con las especificaciones para la formulación y el rendimiento que se describen en la norma ISO 6579: 2002 + A1: 2007 Annex D 1.

Tabla 4. Composición del agar (ISO) semisólidos Rappaport Vassiliadis modificado.

| Fórmula típica * | gr / litro |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Digerido enzimático de tejido animal y vegetal hidrolizado ácido de caseína | 4.6 |
| Cloruro de sodio | 7.3 |
| Dihidrogeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄) | 1.5 |
| Cloruro de magnesio anhidro (MgCl ₂) | 10.9 |
| oxalato de verde de malaquita | 0.04 |
| agar | 2.7 |
| pH 5,2 [†] (5.1 a 5.4) @ 25 ° C | |

Para la determinación de los materiales, se realizó una revisión de equipos y reactivos necesarios para el cumplimiento del procedimiento técnico, el cual se determinó paso a paso teniendo en cuenta todas las condiciones óptimas para el aislamiento de *Salmonella* spp, de igual forma se describió la manera de cómo interpretar los resultados indicando la forma de realizar el recuento.

Para el reporte de resultados se hará uso de un formato de registro de resultados, el cual ya venían implementando en el laboratorio bajo el código RO-116 dispuesto para la captura de datos para métodos cualitativos, este es firmado por el analista responsable del estudio y la persona encargada de la aprobación del análisis.

(Ver Procedimiento técnico de ausencia/presencia de *salmonella* spp en muestras de suelo. Código PTM-48. Anexo 2. Formato: RO-116. Anexo 7)

6.1.3. Procedimiento técnico determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en suelos mediante NMP empleando el caldo LMX fluorocult.

Para la elaboración de este procedimiento técnico se tuvo como referencia la EPA (2006) Método 1680. Este método fue modificado y ajustado de acuerdo a las necesidades del análisis microbiológico de muestras de suelos, para la determinación de Coliformes totales y *E.coli* empleando el caldo LMX fluorocult, basándose en el registro de la documentación antes realizada, en donde se pudo ver como este método fue implementado en análisis microbiológico de muestras de suelo por varios autores.

Luego se describieron los conceptos necesarios para la comprensión y realización del procedimiento.

Igualmente se nombraron los equipos e insumos necesarios para llevar a cabo el procedimiento técnico propuesto.

En cuanto la metodología propuesta esta se determinó paso a paso las pautas para el procesamiento de la muestra de suelo, para tal propósito esta metodología también se expuso en un flujograma para su mayor comprensión.

Para el informe de resultados se hará uso de un formato de registro de resultados, el cual ya venían trabajando en el laboratorio bajo el código RO-122 dispuesto para la captura de datos para métodos del Número Más Probable NMP, este es firmado por el analista responsable del estudio y la persona encargada de la aprobación del análisis.

(Ver Procedimiento técnico determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en suelos mediante NMP empleando el caldo LMX fluorocult. Código PTM-49, formato RO- 122. Anexo 3. Formato: captura de datos para métodos del Número Más Probable NMP anexo 8)

6.1.4. Procedimiento técnico determinación y recuento de hongos totales en muestras de suelos mediante dilución en placa.

Igualmente para la elaboración de este procedimiento se tuvo en cuenta al metodología antes descrita, en la que se realizó una búsqueda bibliográfica empleando bases de datos y la revistas antes mencionadas al igual que artículos científicos y la ISO 16072:2002: la cual tiene como objetivo la determinación de la calidad del suelo a nivel biológico.

Para fundamentar el procedimiento se realiza una descripción del método a implementar el cual es el de recuento por dilución en placa, empleando el agar papa dextrosa PDA, el cual fue elegido por contener infusión de papa como fuente de almidón y la dextrosa como base para el crecimiento de hongos y levaduras, y además por contener un bajo pH (3.5) evita el crecimiento de las bacterias (Scharlaub. 2003).

Con respecto a la metodología, materiales equipos e insumos a emplear en el procedimiento técnico propuesto, se describieron detalladamente para facilitar la comprensión y eficaz ejercitación del protocolo por parte del analista.

Para la interpretación de resultados se realizó una descripción de la morfología macroscópica y microscópica de los posibles hongos que se pueden aislar de muestras de suelo, donde cada descripción fue ilustrada (recomendado por el laboratorio). Además se anexara una clave dicotómica, determinar así los géneros aislados de suelo de manera más confiable y eficaz. Como material de referencia se propuso las cepas ATCC (American type culture collection), se emplearan como control positivo y negativo, *Penicillium* spp ATCC 12,667 y *Streptomyces griseus* ATCC® 10137, respectivamente.

Para el informe de resultados se hará uso de un formato de registro de resultados, el cual ya venían implementando en el laboratorio bajo el código RO-115 dispuesto para la captura de datos para la técnica de recuento en placa, este es firmado por el analista responsable del estudio y la persona encargada de la aprobación del análisis.

(Ver Procedimiento técnico determinación y recuento de hongos totales en muestras de suelos mediante dilución en placa. Código PTM-47. Anexo 4. Formato: captura de datos para la técnica de recuento en placa. RO-115. Anexo 9)

6.1.5. Procedimiento técnico determinación y recuento de actinomicetos mediante el método de dilución seriada a partir de muestras de suelo.

Luego de realizar la revisión de la literatura recopilada y de la ISO 14238:2012, que trata de los métodos biológicos para la determinación de la mineralización del nitrógeno y nitrificación en los suelos. Se estipuló el método a emplear al igual que el medio de cultivo para facilitar el aislamiento de los Actinomicetos. El medio escogido es el agar Ashby, el cual es un medio de cultivo microbiológico utilizado para el aislamiento de microorganismos que pueden fijar el nitrógeno atmosférico. En este caso los Actinomicetos. El método a implementar sería el de diluciones seriadas, debido a la extensa población de Actinomicetos en el suelo.

En cuanto la metodología propuesta se determinó paso a paso las pautas para el procesamiento de la muestra de suelo, para tal propósito esta metodología también se expuso en un flujograma para su mayor comprensión se realizó de forma gráfica.

Para el informe de resultados se hará uso de un formato de registro de resultados, el cual ya venían trabajando en el laboratorio bajo el código RO-115 dispuesto para la captura de datos para métodos recuento en placa en superficie, este es firmado por el analista responsable del estudio y la persona encargada de la aprobación del análisis.

(Ver Procedimiento técnico determinación y recuento de actinomicetos mediante el método de dilución seriada a partir de muestras de suelo. Código PTM-50. Anexo 5. Formato: captura de datos para la técnica de recuento en placa. Anexo 9)

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El contenido de este trabajo de grado es de vital importancia para el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S*, ya que aporta una herramienta fundamental, como lo es la documentación y elaboración de los procedimientos técnicos para análisis de suelo a nivel microbiológico; contribuyendo así a que el laboratorio se acerque aún más al cumplimiento de la visión planteada en el sistema de gestión de calidad, en la cual el laboratorio se visualiza para el año 2018 en consolidarse como un laboratorio de referencia líder a nivel regional en la prestación de servicios de toma de muestras y control de calidad de aguas, alimentos, ambientes, superficies, suelos, productos farmacéuticos y cosméticos. Siendo reconocidos por la confiabilidad, pertinencia y oportunidad de los resultados, comprometidos con el medio ambiente y el desarrollo de nuestra región.

El laboratorio en la actualidad cuenta con la mayoría de las prestaciones de servicios antes nombradas, haciendo énfasis en el aseguramiento de la calidad de las muestras analizadas; apoyándose en un recurso humano calificado, con equipos de última tecnología, cumpliendo las metodologías científicas aprobadas por organizaciones Nacionales e Internacionales, con el fin de apoyar el desarrollo de sus clientes, asegurando el bienestar de los consumidores, comunidad en general y preservación del medio ambiente. Sin embargo el propósito del *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S* es seguir creciendo como empresa para lo cual ha decidido incluir nuevos servicios con estándares de calidad como lo es el análisis microbiológico de suelo. Para efectuar tal objetivo, el presente trabajo se estableció la documentación necesaria para la elaboración de los procedimientos técnicos para el análisis de suelo a nivel microbiológico; permitiendo así unificar y establecer pautas que garantice la ejecución de la metodología a realizar para determinar la calidad microbiológica de suelo.

7.1. REVISIÓN BIOGRÁFICA.

Al realizar una revisión bibliográfica, sobre el análisis microbiológico de suelo, antes de la elaboración de los procedimientos técnicos permitió preparar la información en una forma ordenada y sistematizada, contar con el conocimiento necesario para realizar un trabajo confiable y sobre todo minimizar errores a la hora de la ejecución de los procedimientos técnicos elaborados permitiendo así resultados garantizados, evitando pérdidas económicas. Además la documentación realizada como producto de esta revisión en revistas, artículos y demás; es una herramienta primordial que aporta al analista (persona encargada de procesar la muestra) el conocimiento necesario para la determinación de la calidad del suelo a nivel microbiológico.

Como resultado de este trabajo se documentó: 5 procedimientos técnicos, con la finalidad de analizar muestras de suelo a nivel microbiológico. Los resultados obtenidos de dicho análisis serán registrados en formatos de registros técnicos los cuales están relacionados a cada procedimiento elaborado.

Los procedimientos técnicos elaborados al igual que los formatos para registro de los resultados generados del análisis, fueron codificados por parte de Maria Francisca Aroca la persona encargada del sistema de gestión de calidad del laboratorio.

Se ha establecido la asignación de un código a los documentos para su identificación y control, esta codificación está relacionada

Al codificar la documentación resultante de este trabajo de grado, ayuda a controlar la información entre las personas autorizadas para acceder a ella, y a la vez ayuda a una identificación de la misma de una forma más eficaz y sencilla.

8. CONCLUSIONES.

- ✓ Se cumplió con la realización de procedimientos técnicos bajo la normatividad vigente para el estudio microbiológico de suelo, teniendo como referencia general la ISO 16072:2002. La cual tiene como objetivo primordial la calidad biológica del suelo.
- ✓ La revisión de bases de datos, revistas y normas vigentes sobre el estudio microbiológico de suelo, fue una herramienta fundamental, puesto que facilitó la determinación y elaboración de los procedimientos técnicos para análisis microbiológico de suelo, para así contribuir a la apertura del área de análisis de suelo en el *Laboratorio Ambiental y de Alimentos Nancy Flórez García S.A.S.*
- ✓ Se elaboraron los procedimientos técnicos destinados a la determinación de la calidad microbiológica de muestras de suelo asociadas con hongos, actinomicetos y Enterobacterias (*Salmonella* spp y *E. coli*), de gran importancia para el laboratorio, ya que se trataba de las técnicas que faltaban al laboratorio para prestar un servicio completo, en cuanto la determinación de la calidad del suelo, ya que contaría con análisis fisicoquímico e identificación microbiológica de los microorganismos presentes en las muestras de suelo; y así cumplir en parte con el objetivo de crecer como empresa, siendo un laboratorio de referencia líder a nivel regional en la prestación de servicios de toma de muestras y control de calidad de aguas, alimentos, ambientes, superficies, suelos, productos farmacéuticos y cosméticos.

9. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS.

Tras la documentación y posterior finalización del trabajo de grado, se sugiere que los procedimientos técnicos elaborados, sean implementados y valorados para demostrar que los protocolos son claros, reproducibles y que cumplan con el objetivo para el cual fueron diseñados.

Además se recomienda seguir realizando revisiones en cuanto normatividad y material de referencia que respalden el estudio microbiológico de suelos, con la finalidad de elaborar más procedimientos técnicos, brindando así un servicio más amplio a los clientes interesados en la detención de la calidad microbiológica de muestras de suelo.

Como sugerencia general se recomienda diseñar o asignar un área exclusiva para el análisis microbiológico de suelos.

10. GLOSARIO

Actinomicetos: son microorganismos del suelo caracterizados por ser organismos intermedios entre los hongos y las bacterias. Tienen aspecto filamentosos y, al igual que los hongos, la capacidad de segregar antibióticos (estreptomina, aureomicina, terramicina, cloromicetina y tetraciclina).

Por otro lado, como las bacterias, los actinomicetos realizan numerosas reacciones bioquímicas y participan en el proceso de formación de humus y en la alimentación de las plantas al mineralizar la materia orgánica. Algunas especies pueden fijar nitrógeno atmosférico en asociación con algunas especies de árboles. Su número en el suelo agrícola es elevado (un millón a cien millones por gramo de tierra). Su peso medio es de una tonelada por hectárea.

Agar Ashby: medio de cultivo microbiológico utilizado para el aislamiento de microorganismos que pueden fijar el nitrógeno atmosférico. En este caso los Actinomicetos.

Enterobacterias: (orden Enterobacteriales y única familia Enterobacteriaceae) son bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de cocos o bacilos.

Escherichia coli: también conocida por la abreviación de su nombre, *E. coli*, es quizás el organismo procarionta más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se le puede encontrar en multitud de ambientes, dado que es un organismo ubicuo.

EPA: Sigla de la expresión inglesa Environmental Protection Agency. Agencia de Protección Ambiental.

Hongos totales: son organismos eucariotas que pertenecen al reino *Fungi*. Los hongos forman un grupo polifilético (no existe un antepasado común a todos los miembros) y son parásitos o viven sobre materias orgánicas en descomposición.

NTC: Norma Técnica Colombiana.

Muestra: representación de un agente destinado a un estudio.

La revisión bibliográfica es un procedimiento estructurado cuyo objetivo es la localización y recuperación de información relevante para un individuo que quiere dar respuesta a cualquier duda relacionada con su práctica, ya sea ésta clínica, docente, investigadora o de gestión.

Revisión Documental: Es una técnica de observación complementaria, en caso de que exista registro de acciones y programas. La revisión documental permite hacerse una idea del desarrollo y las características de los procesos.

Salmonella spp: es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *S. typhi* (MOOIJMAN, 2014) ni esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S). Emplean glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa ni tienen metabolismo fermentativo.

Sucesión ecológica: es la evolución que se da de manera natural, produciendo que un ecosistema por su propia dinámica interna sustituya a los organismos que lo integran. El término alude a su aspecto esencial en la sustitución, a lo largo del tiempo, de unas especies por otras.

Suelo: es la capa superficial de la tierra en donde se realizan actividades bioquímicas y físicas, a causa de las relaciones entre suelo, organismos y medio ambiente.

ISO: Sigla de la expresión inglesa International Organization for Standardization, 'Organización Internacional de Estandarización', sistema de normalización internacional para productos de áreas diversas. Norma ISO Norma definida por la Organización Internacional de Normalización que se aplica a los productos y servicios.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña Oscar; Peña Wagner; Serrano Edgardo; Pocasangre Luis; Rosales Franklin; Delgado Eduardo; Trejos Javier; & Segura Álvaro. El suelo y los microorganismos en el ecosistema. [En línea] <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/303019/5.salud_del_suelo.pdf > [Citado el 15 de abril de 2016]
2. Agencia de Protección Ambiental. Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium. Estados Unidos. 2005. 48h. : il (EPA: 821R04028).
3. Álvarez, Martha 2008, Plagas y enfermedades, Ed. Albatros, Buenos Aires, Argentina Agricultura Orgánica Harina de Rocas y la Salud del Suelo al alcance de todos. Restrepo Rivera. Jairo, Pinheiro. Santiago. Brasil – Colombia – México. 2014. (en línea) <<http://www.agriculturaorganica.org/wp-content/uploads/2010/12/Agricultura-Organica-Harina-de-rocas-y-salud-del-suelo.pdf>> [citado el 12 de mayo de 2016]
4. Annarella Rodríguez Isaac., et al. Determinación de coliformes totales y E.coli en aguas utilizando el Fluorocult LMX (MERCK) I. Comparación con los medios de cultivo tradicionales. EN: INGENIERÍA HIDRÁULICA Y AMBIENTAL. [en línea] VOL. XXIV. No. 3. (2008) <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/ispjae/coliformes.pdf>> [citado el 05 de junio de 2016]
5. Báez Ana. técnicas de investigación documental. [en línea] <<http://dani14238551.blogspot.com.co/2009/03/la-recopilacion-documental-como-tecnica.html>> [citado el 8 de marzo de 2016]
6. Beauregard M, Khatri V, Hébert-Ouellet Y, Meddeb-Mouelhi M, 2010. Long-Term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. *Microb Ecol.*59:379–389.
7. Ben-David EA, Zaady E, Sher Y, Nejdat A.2011. Assessment of the spatial distribution of soil microbial communities in patchy arid and semi-arid landscapes of the Negev Desert using combined PLFA and DGGE analyses. *FEMS Microbiol Ecol.* 76:492–503.
8. Boff, Leonardo. Ecología: grito de la tierra, grito de los pobres. [En línea] <<http://www.iberlibro.com/buscar-libro/titulo/ecologia-grito-de-la-tierra-grito-de-los-pobres/>> [citado el 23 de abril de 2016].
9. Coleman DC, Whitman WB. 2008. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia.*49:479–497.

10. Cooper Louis. 2009. Salmonellosis – infections in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines – a review. *Vet. Bull.*, 64, 123–143.
11. Cruz Colón Yazmín. Resumen de La Recopilación Documental como Técnica de Evaluación y Monitoreo. [en línea] <<http://organizacionessinfinesdelucroenlared.blogspot.com.co/2012/01/la-recopilacion-de-documentacion-para.html>> [citado el 27 de abril de 2016]
12. Eaton, W. D., y Chassot, O. 2012. Characterization of soil ecosystems in Costa Rica using microbial community metrics. *Tropical Ecology*, 53 (2), 185-195.
13. EPA Method 1699: Pesticides in Water, soil, sediment, Biosolids, and Tissue bby HRGC/HRMS. [En línea] <www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1699_2007.pdf> [citado el 14 mayo de 2016]
14. EPA [2006] Method 1680: Fecal Coliforms in Biosolids by Multiple-Tube Fermentation Procedures.[En línea] <[https://www.epa.gov/assessing-and-managing-environmental-effects-and-impacts/assessing-and-managing-environmental-effects-and-impacts/a4c68ba09ee5218c8525](https://www.epa.gov/assessing-and-managing-environmental-effects-and-impacts/assessing-and-managing-environmental-effects-and-impacts/assessing-and-managing-environmental-effects-and-impacts/a4c68ba09ee5218c8525)> [consultada el 28 de abril de 2016]
15. Fernández Linares Luis Carlos et al. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados D. R. ©2006, Instituto Mexicano del Petróleo. ISO 16072:2002: Soil quality -- Laboratory methods for determination of microbial soil respiration.
16. Franco, M, 2008. Assessment of characters PGPR in Actinomycetes and interactions of these Rhizobacteria with mycorrhizalfungi. University of Granada. Department of Plant Physiology. Doctoral Thesis.
17. Ge Murgan. 2008. Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies [base de datos en línea] Vol. 2 no. 3 (marzo de 2008) pag ISME J. 2:254–264. [citado el 14 de abril de 2016] disponible ENB. DOI: 10.1038 / ismej.2008.2 · Fuente: PubMed
18. Higa teruo. Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenible. Centro Internacional de Investigación de Agricultura Natural. [en línea] <http://fundases.com/userfiles/file/MicroorG_Benef_Efect.pdf> [citado el 05 de junio de 2016]
19. ISO 16072:2002: Soil quality -- Laboratory methods for determination of microbial soil respiration. [en línea] <http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=32096> [citado el 20 marzo de 2016]

20. ISO 14238:2012. Soil quality — Biological methods — Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes. [en línea] <http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=56033> [citado el 20 de marzo de 2016]
21. ISO 10381-1:2007 Calidad del suelo. Muestreo. Parte 1: Directrices para el diseño de los programas de muestreo. (ISO 10381-1:2002) [en línea] <<http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0039566#.V1UlaTXhC1s>> [citado el 19 de marzo de 2016]
22. ISO 10381-2:2002 Soil quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques. [En línea] <http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=32424> [citado el 19 de marzo de 2016]
23. Ibáñez Juan José. Procesos Edáficos y Procesos Relacionados con los Suelos. [En línea] <<http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2008/09/09/100525>> [citado el 12 de mayo de 2016].
24. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. calidad de suelo. muestreo. parte 4. guía sobre el procedimiento para la investigación de sitios naturales, semi-naturales y cultivados. Bogota. ICONTEC. 2004. 4 h: il (NTC 4113-4)
25. Kibblewhite, et al. Soil health in agricultural systems. Phil. Trans. R. Soc. B, 363, 685-701.
26. Lesschen J. P. Development of spatial heterogeneity in vegetation and soil properties after land abandonment in a semi-arid ecosystem, [base de datos en línea] 2008, Journal of Arid Environments, vol.72, pp. 2082-2092, disponible en PubMed - NCBI
27. Martínez H Eduardo et al. CARBONO ORGÁNICO Y PROPIEDADES DEL SUELO. Soil organic carbon and soil properties. EN: Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal. [en línea]. v.8 n.1 (Temuco 2008). <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-27912008000100006> [citado el 5 de junio de 2016]
28. Menéndez JLM. Contaminación ambiental por antibióticos y determinantes de resistencia a los antibióticos. [En línea] <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/aidis12/prueba.pdf>> [citado el 15 de abril de 2016]

29. Mooijman K.A. 2014. The use of semi-solid media for the detection of *Salmonella* spp. in poultry faeces and other matrices. Working document ISO/TC34 SC9 N681
30. Norma Técnica Colombiana. Documentación. Presentación de tesis trabajo de grado y otros trabajos de investigación. Bogota. ICONTEC. 2008,. 14237. (NTC 1486).
31. Prieto A Ruiz. 2008. Establecimiento y documentación de los requisitos de gestión de la norma NYC-ISO-IEC 17025 dentro del programa de adecuación del laboratorio de ensayos de la clínica Fray Bartolomé de las casas. Tesis de grado. Microbiología ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
32. Radjacommare, R.; Venkatesan, S.; Samiyappan, R. 2010. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology and Plant Protection*. 43(1):1-17.
33. Siddiqui, Z.A.; Akhtar, M.S. 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Sci. Techn.* 18(3):279-290.
34. Suzuki C,. 2009. Bacterial communities are more dependent on soil type than fertilizer type, but the reverse is true for fungal communities. *Soil Sci Plant Nutr.* 55:80–90.
35. Tirado Gallego Paola Andrea. LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO. [en línea] <<http://micropao.blogspot.com.co/2010/06/los-microorganismos-del-suelo.html>> [citado el 3 de junio de 2016].
36. US EPA. 1994a. Sampling equipment decontamination. Standard Operating Procedure 2006.
37. US EPA. 1994b. Soil sampling. Standard Operating Procedure 2012.
38. US EPA 540/R-95/141PB96-963207. 1995. Superfund Program Representative Sampling Guidance. OSWER directive 9360.4-10.
39. US EPA 660/4-90/013. 1990. A rationale for the assessment of errors in the sampling of soils. Las Vegas.
40. US EPA 600/R-92/128. 1992. Preparation of soil sampling protocols. Sampling techniques and strategies. Office of Research Development.
41. US EPA 625/4-91/026. 1991. Seminar publication. Site characterization for subsurface remediation.

42. US EPA 160014-891034. 1991. Handbook of suggested practices for the design and installation of ground-water monitoring wells.
43. Wyatt H. Hartman, Curtis J. Richardson, Rytas Vilgalys, and Gregory L. Bruland. 2008. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proc. Natil. Acad, Sci USA*.105:17842–17847.

12. ANEXOS.

Anexo 1. Procedimiento para la toma de muestras de suelos destinados a los análisis microbiológicos. PO-40

Anexo 2. Procedimiento técnico de ausencia/presencia de salmonella spp en muestras de suelo. PTM-48

Anexo 3. Procedimiento técnico determinación de coliformes totales y Escherichia coli en suelos mediante NMP empleando el caldo LMX fluorocult PTM-49

Anexo 4. Procedimiento técnico determinación y recuento de hongos totales en muestras de suelos mediante dilución en placa. PTM-47

Anexo 5. Procedimiento técnico determinación y recuento de actinomicetos mediante el método de dilución seriada a partir de muestras de suelo. PTM-50

*Anexo 6. Formato de toma de muestra y transporte de muestras de suelos código **RO-07**.*

*Anexo 7. Formato de captura de datos para métodos cualitativos **RO-116***

Anexo 8. Formato de captura de datos para métodos del Número Más Probable NMP RO- 122

*Anexo 9. Formato de captura de datos para la técnica de recuento en placa **RO-115***

Anexo 10. Instructivo de toma de muestra de suelo del complejo de laboratorios- bolsa de comercio del Rosario

Anexo 11. Clave dicotómica para identificación de los géneros aislados de muestras de suelo.