

Recibido: 10/05/17; Aceptado: 25/11/17

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

indexada en



<http://www.latindex.unam.mx/>



<http://miar.ub.edu/issn/2304->



Efecto del uso de cáscaras de cítricos sobre el aislamiento y cuantificación de *Pseudomonas* spp. en suelo bajo ensayo experimental.

Effect of the use citric shells on isolation and quantification of *Pseudomonas* spp. in soil under experimental test.

¹Alexis De La Cruz L.

¹MSc. Profesor, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Centro Regional Universitario de Azuero, Universidad de Panamá; alexisdelac@gmail.com

Resumen

Las cáscaras de los cítricos puede ser utiliza para la elaboración de compostaje. En esta se encuentran los aceites esenciales, comprendidos por los diferentes terpenoides, siendo el limoneno el más abundante. *Pseudomonas* sp. es una bacteria capaz de crecer en diferentes ambiente y de utilizar los compuestos disponibles como fuente de carbono, incluso utiliza los hidrocarburos. Mediante este estudio evaluaremos el efecto que tiene el uso de cáscaras de cítricos sobre el crecimiento de *Pseudomonas* sp en suelo bajo

condiciones experimentales, donde el mayor recuento de colonias de *Pseudomona sp.* se obtuvo en el tratamiento de suelo con cáscara de limón. Demostrando de este modo que *Pseudomona sp.* puede degradar los aceites esenciales de la cascara de los cítricos, para suplir sus necesidades nutricionales.

Palabras clave: cítricos, limoneno, *Pseudomona sp.* Terpenoides

Abstract

Citrus peels can be used to make compost. In this compost are found essential oils composed of terpenoids, being the limonene the most abundant. *Pseudomonas sp.* is bacteria capable of growing in different environment and using available compounds as carbon source even it uses hydrocarbons. Through this study we will evaluate the effect of the use of citrus peels on the growth of *Pseudomonas sp.* in soil under experimental conditions, where the largest colony count of *Pseudomonas sp.* was obtained in the treatment of soil with lemon peel. Thus demonstrating that *Pseudomonas sp.* can degrade the essential oils of citrus peel, to meet their nutritional needs.

Keywords: citrus, limonene, *Pseudomonas sp.* terpenoids.

INTRODUCCIÓN

Las cáscaras y otros residuos de los cítricos, son utilizados para la elaboración del compostaje, pero en pequeñas cantidades, ya que pueden tardar un poco en descomponerse y a su vez los mismos pueden acidificar el compostaje.

En la cáscara de los cítricos, la mayor parte de los compuestos volátiles aromáticos están en el flavedo, en el mismo, se encuentra los aceites esenciales. (Quiroz, 2009)

Los terpenoides y los terpenos son compuestos aromáticos que se encuentran en miles de especies de plantas, y son responsables de los diferentes sabores y aromas del cannabis.

Poseen una amplia clase de compuestos orgánicos de origen natural; también se conocen como isoprenoides, ya que su estructura se basa en la repetición de unidades de isopreno (C_5H_8). Los terpenos son los principales componentes de la resina de las plantas y de los aceites esenciales extraídos de dichas plantas. (Fundación Canná, s.f)

Estos compuestos químicos mencionados anteriormente se encuentran en las cáscaras de los frutos cítricos. Por ende el desecho de cítricos es utilizado en la fabricación de compost, siendo una técnica de transformación de material orgánico en donde éste se descompone. Estas transformaciones son el resultado de la actividad de bacterias, hongos y otros microorganismos que utilizan el sustrato orgánico como fuente de energía y nutrientes.

Al añadirle *Pseudomona* spp. a la técnica de composts, es capaz de tomar los compuestos terpenoides de las cascarras de los cítricos y crear un grado de complejidad, lo que la hace más resistente y poder ser aplicada en suelos contaminados con hidrocarburos.

El objetivo de este trabajo e investigación consistió en evaluar el efecto que tiene uso de cáscaras de diferentes cítricos sobre el crecimiento de *Pseudomona* sp. bajo condiciones experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Ubicación del estudio

Unidad de Investigación del Centro Regional Universitario de Azuero- Chitré.
Coordenadas: latitud $7^{\circ}57'23.41''$ N y longitud $80^{\circ}25'08.12''$ O.

Diseño del estudio:

Se le aplicó cuatro tratamientos a un mismo suelo, bajo condiciones experimentales, los cuales contenían *Pseudomona* sp. y cáscara de naranja, limón y naranjilla, en un periodo de 21 días, para verificar la prevalencia de *Pseudomona* sp.

b. Hipótesis de la investigación:

H_i: La aplicación de cáscara de diferentes cítricos tiene efecto sobre el aislamiento y cuantificación de *Pseudomona sp.* en suelo de ensayos experimentales.

c. Variables de la investigación:

Variable independiente:

- La prevalencia de *Pseudomona sp.* Se determinó mediante el recuento de las colonias *Pseudomonas sp.* en agar tripticasa de soya.

Variables dependientes:

- Tratamiento 1 (T1): *Pseudomona sp.* y cáscara de naranja.
- Tratamiento 2 (T2): *Pseudomona sp.* cáscara de limón.
- Tratamiento 3 (T3): *Pseudomona sp.* cáscara de naranjilla.
- Tratamiento 4 (T4): *Pseudomona sp.*

d. Preparación del suelo:

Se pesaron 170,0g de tierra negra y se colocaron en bandejas de aluminio selladas, las mismas se dejaron en el horno por 10 días a 80°C para esterilizar el suelo.

Enriquecimiento de la cepa *Pseudomona sp.*: Este se realizó dos días antes de la preparación de los tratamientos, donde se preparó 500 ml de caldo tripticasa de soya, al cual se le inoculó una cepa aislada de *Pseudomona sp.*, esta se incubó durante dos días. Para verificar su pureza y la concentración se realizaron dos pases directos a agar Cetrimide.

e. Procesamiento de las cáscaras:

Las cáscaras que se utilizaron fueron la de los siguientes cítricos: naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus limon*) y naranjilla (*Citrus limonia*). Estas fueron cortadas en pequeños trozos de 1,5cm X 0,5 cm. Luego estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 2 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril, luego con etanol al 94% durante 2 minutos y se enjuagaron nuevamente con agua destilada estéril. Dejándose escurrir.

f. Preparación de los tratamientos:

Estos se basaron en la aplicación de *Pseudomona sp.* y cáscaras de cítricos en el suelo estéril para los tratamientos positivos, *Pseudomona sp.* en suelo estéril para los controles y suelo sin inocular y sin cáscara para el blanco.

- Los tratamientos con cáscara de cítricos consistieron en revolver las cáscaras en las bandejas con suelo el estéril, una bandeja por cada cítrico, luego se remojó el suelo con agua destilada estéril y con un atomizador estéril se colocó la *Pseudomona sp.* en cada bandeja.
- Los tratamientos sin cítricos o controles, el suelo se remojó con agua destilada estéril y se añadió la *Pseudomona sp.* con el atomizador.
- El blanco consistió solo en añadir agua destilada estéril para remojar el suelo.

Los tratamientos con cáscara de cítricos, los controles y el blanco fueron guardados en cajas separadas y selladas durante 18 días.

g. Diluciones:

Pasado los 18 días se pesaron 10 g de suelo de cada tratamiento y se colocaron en 90 ml de agua destilada estéril para obtener la muestra madre, a partir de esta se realizaron las diluciones en serie tomando 1ml de muestra en 9ml de agua destilada estéril. De cada dilución se extrajo 100µl vertiéndose en placas Petri con agar tripticasa de soya. Esta se incubaron durante 48h a 37° C. Pasado las 48h cada placa se llevó a el contador de colonias para su recuento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro N° 1: Recuento de colonias en los tratamientos de control suelo con *Pseudomona sp.* Junio 2016.

| fd | Control 1 | | Control 2 | | Control 3 | | Blanco | |
|------------------------|-----------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|---------------------|--------|----------------|
| | C | UFC/10 g ·fd | C | UFC/10 g·fd | C | UFC/10 g·fd | C | UFC/1 0g·fd |
| M | 364 | 3,64X10 ₂ | 22 | 2,20X10 ₁ | 1 | 1,0X10 ¹ | 0 | 0 |
| 10⁻¹ | 72 | 7,20X10 ₂ | 42 | 4,20X10 ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10⁻² | 9 | 9,0X10 ² | 4 | 4,0X10 ² | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10⁻³ | 1 | 1,0X10 ³ | 3 | 3,0X10 ³ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10⁻⁴ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10⁻⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

fd- factor de dilución; C- colonias; M- muestra madre; UFC- unidades formadoras de colonias



Nota: control 2 dilución 1 error experimental.

Figura N° 1: Colonias de *Pseudomonas sp* en las placas Petri con TSA. a. Control 1, dilución 1; b. Control 2, dilución 1; c. Control 3, dilución 1. En esta última, la colonia se encontraba en el centro de la placa, su tamaño era reducido.

Cuadro N° 2: Recuento de colonias en los tratamientos de suelo con cáscara de cítricos (naranja, limón y naranjilla) y *Pseudomonas sp*. Junio 2016.

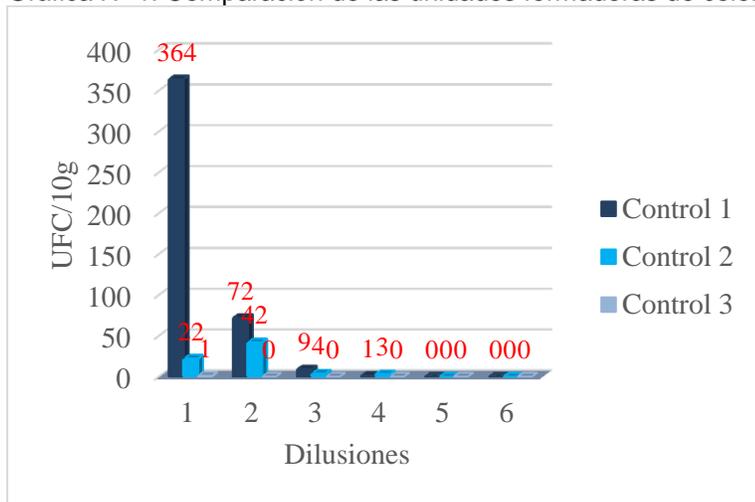
| fd | Naranja | | Limón | | Naranjilla | | Blanco | |
|------------------|---------|---------------------|-------|----------------------|------------|---------------------|--------|----------------|
| | C | UFC/10 g ·fd | C | UFC/10 g·fd | C | UFC/10 g·fd | C | UFC/1 0g·fd |
| M | 29 | 2,9X10 ¹ | 224 | 2,24X10 ² | 66 | 6,6X10 ¹ | 0 | 0 |
| 10 ⁻¹ | 7 | 7,0X10 ¹ | 40 | 4,0X10 ² | 27 | 2,7X10 ² | 0 | 0 |
| 10 ⁻² | 1 | 1,0X10 ² | 9 | 9,0X10 ² | 11 | 1,1X10 ³ | 0 | 0 |
| 10 ⁻³ | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2X10 ³ | 0 | 0 |
| 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

fd- factor de dilución; C- colonias; M- muestra madre; UFC- unidades formadoras de colonias



Figura N° 2: Colonias de *Pseudomonas sp* en las placas Petri con TSA. a. tratamiento con cáscara de naranja; b. tratamiento con cáscara de limón; c. tratamiento con cáscara de naranjilla.

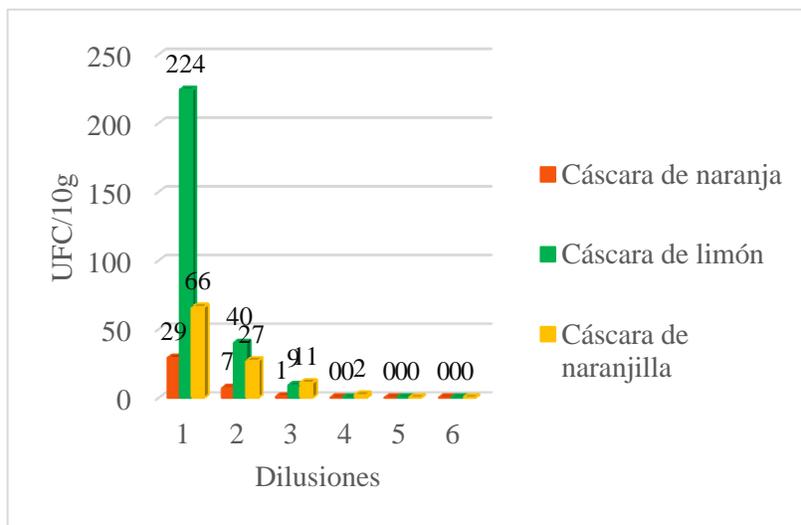
Gráfica N° 1: Comparación de las unidades formadoras de colonia por tratamiento control. Junio 2016



Nota: la dilución 1 corresponde a la muestra madre, a partir de la dilución dos se contaría como la primera dilución.

En la dilución 2 del control 2 al parecer se presentó un error experimental ya que no concuerdan los resultados. El control 3 presento una sola colonia. Esto pudo deberse a la resequedad del suelo, puesto que a la hora de pesar los 10 g de suelo, la bandeja estaba casi seca, de este mudo pudo alterarse el resultado.

Gráfica N° 2: Comparación de las unidades formadoras de colonia por tratamiento de suelo con cáscara de cítrico. Junio 2016



Nota: la dilución 1 corresponde a la muestra madre, a partir de la dilución dos se contaría como la primera dilución.

Como se observa en la gráfica N° 2 hubo mayor recuento en el tratamiento con cascara de limón, seguido por la naranjilla y por último la naranja.

Tomando en cuenta estos resultados cabe resaltar que estos materiales (cáscara o pulpa de naranja, limón, mandarina, pomelo) en el compost ahuyentan las moscas y son una fuente importante de fósforo y potasio. (Basaure, 2006)

Es importante dejar secar las cáscaras y cortarlas en trozos pequeños que favorecen la aireación, antes de agregar al compost. El exceso de líquidos puede ser perjudicial para el preparado y por eso es importante controlarlo. Las mismas suelen aportar valores bajos de pH ya que son ricos en ácidos orgánicos. De manera que es importante controlar la cantidad de estos restos que se incorpora para no excederse y volver así más lento el proceso de compostaje. (Reciclario.com.ar una guía para separar los residuos, s.f)

Como se mencionó con anterioridad el limoneno es una sustancia natural que se extrae del aceite de las cáscaras de los cítricos y que da olor y color característico a las naranjas y los limones. Pertenece al grupo de los terpenos, en concreto al de los limonoides, que constituyen una de las más amplias clases de alimentos funcionales y fitonutrientes, funcionando como antioxidantes. Industrialmente se utiliza para producir para-cimeno por deshidrogenación catalítica. En los últimos años su demanda ha experimentado un gran crecimiento para su uso como disolvente biodegradable. (Díaz *et al.* 2010).

El limón contiene aproximadamente 2% de sustancias no volátiles, alrededor de 18 alcoholes, 16 aldehídos, 11 ésteres, 3 cetonas, 4 ácidos y 23 hidrocarburos. Los componentes mayoritarios del aceite esencial cáscara son:

- 63% limoneno (Monoterpeno monocíclico)
- 12% beta-pineno (Monoterpeno Bicíclico)
- 9% gama-terpeno (Monoterpeno monocíclico)

Otros componentes cualitativamente importantes son:

- 1.5% geranial (aldehído)
- 1.0% neral (limón) (aldehído)
- 0.5% neril acetato (frutal, floral, rosa)
- 0.4% geranil acetato (frutal, floral, rosa)
- 0.2% citronelal (fuerte, cítrico, verde)
- 0.2% linalol (brillante, lavanda) (monoterpeno acíclico)
- 0.1% nonanal (fuerte) (Díaz *et al.* 2010).

El limoneno presente en la cascara del limón es el dextrógiro (+) es un líquido aceitoso y es el responsable de su olor. (Química orgánica, s.f).

Pseudomonas sp puede vivir en numerosos hábitats, que van desde diversos tipos de ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos de animales y plantas, incluyendo frutas y verduras.

El hábitat primario es ambiental esencialmente, cualquier hábitat con las siguientes características:

- Rango de temperatura de 4-42°C.
- pH comprendido entre 4 y 8.
- Que contenga compuestos orgánicos simples o complejos.

Debido a que la mayoría de las especies de este género son aeróbicas estrictas, el oxígeno es aparentemente casi el único requerimiento obligatorio para la colonización de un ambiente de *Pseudomonas*. (Hernández, 2013).

Se desarrolla no sólo en ambientes normales, sino también en las atmósferas de hipoxia, y tiene, por lo tanto, colonizado muchos ambientes naturales y artificiales. Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el ambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. (Hernández, 2013). La

misma es capaz de utilizar el limoneno y degradarlo a carveol, carvona y dihidrocarvona. (García *et al.* 2004).

CONCLUSIONES

Finalizado el este ensayo se puede concluir lo siguiente:

- Se acepta la hipótesis de investigación ya que se encontró una alta prevalencia de *Pseudomona sp.* en los tratamientos de suelo con cascara de cítricos.
- Las cáscaras de naranja, limón y naranjilla pueden ser utilizadas por *Pseudomona sp.* aunque esta muestra mejor crecimiento en cascara de naranjilla y limón.
- *Pseudomona sp* tuvo mayor prevalencia en el tratamiento de suelo con cáscara de limón, lo que puede deberse a una preferencia por los componentes presentes en las cáscaras, en especial al isómero R-limoneno.
- Las cáscaras de cítricos pueden agregarse de manera cuidadosa y sin exagerar en la preparación del compostaje, para no alterar sus propiedades físicas químicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alanís, E., Guerrero, I. (s.f). *Pseudomona* en biotecnología. Revisado: 12 de Mayo de 2016. Recuperado de: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2004_1/Pseudomonas.pdf

Chacón, G. (s.f). Proyecto: Manejo y tratamiento Natural de Cáscaras de Naranja. Revisado: 12 de Mayo de 2016. Recuperado de: <http://www.acguanacaste.ac.cr/rothschildia/v5n1/textos/07.html>

CleanTool (s.f). Terpenos. Revisado 18 de Mayo de 2016. Recuperado de: <http://www.cleantool.org/teilereinigung/reiniger/terpene/?lang=es>

Díaz, A. (2013). La jornada: desarrollan en el Cinvestav nueva técnica para descontaminar el suelo. Revisado: 12 de Mayo de 2016. Recuperado de: <http://www.jornada.unam.mx/2013/01/11/sociedad/043n2soc>

Díaz, A., Campos, J. (2012). Convergencia catabólica de las rutas degradativas de isoprenoides acíclicos y de leucina en bacterias del género *Pseudomonas*.

Revisado: 24 de Mayo de 2016. Recuperado de:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2012/reb124c.pdf>

Escobar, M. (2010). Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. Revisado 18 de Mayo de 2016. Recuperado de:
<http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9612/34.pdf?sequence=1>

Fundación Canná (s.f). Los terpenos. Revisado: 20 de junio de 2016. Recuperado de:
<http://www.fundacion-canna.es/los-terpenos>

García, M., Quintero, R., López, A. (2004). Biotecnología alimentaria. Revisado: 20 de junio de 2016. Recuperado de:
https://books.google.com.pa/books?id=2ctdvBnTa18C&pg=PA461&lpg=PA461&dq=pseudomona+en+limoneno&source=bl&ots=_qCa1itEAe&sig=8rIA01_SZ0B1FVxTRkp0d-W8kEI&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=pseudomona%20en%20limoneno&f=false

Hernández, M. (2013). Pseudomonas. Revisado: 20 de junio de 2016. Recuperado de:
https://prezi.com/i_nx2znudlzd/pseudomonas/

Isaza, G., Pérez, M., Laines, J., Castañón, G. (2009). Comparación de dos técnicas de aireación en la degradación de materia orgánica. Revisado: 12 de Mayo de 2016. Recuperado de:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-2979200900030005

Malajovich, M. (s.f) Biodegradación de pectina. Revisado: 18 de Mayo de 2016. Recuperado de: http://bteduc.bio.br/guias_es/77_Biodegradacion_de_pectina.pdf

Mas a tierra ecológico. (2012). Cáscaras de fruta. Revisado: 12 de Mayo de 2016. Recuperado de: <https://masatierraecologico.wordpress.com/2012/06/27/cascaras-de-fruta-5-dias-a-6-meses/>

Orbegoso, A., Germán, A. (s.f). Producción de pectinasas por actinomicetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. Revisado: 18 de Mayo de 2016. Recuperado de:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/arroyo_o_a/cap2.htm

Química Orgánica (s.f). Limoneno. Revisado 20 de junio de 2016. Recuperado de:
<http://www.quimicaorganica.net/limoneno.html>

Quiroz, A. (2009). Utilización de residuos de cáscara de naranja para la preparación de un desengrasante doméstico e industrial. Revisado: 18 de Mayo de 2016. Recuperado de: <http://repositorio.uisek.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/407/1/Utilizaci%C3%B3n%20de%20residuos%20de%20c%C3%A1scara%20de%20naranja%20para%20la%20preparaci%C3%B3n%20de%20un%20desengrasante%20dom%C3%A9stico%20e%20industrial>

21 de junio de 2016. Recuperado de: <http://reciclario.com.ar/compostable/cascara-de-mandarina/>

Rojas, J. (2006). Determinación por HPLC de naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina en jugos cítricos y aplicación de naringinasa en el jugo de mandarina. Revisado: 18 de Mayo de 2016. Recuperado de: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/531/2/122004.pdf>

Schwab, W., Fuchs, C., Chin, F. (s.f). Transformación de terpenos en productos químicos finos. Revisado: 23 de Mayo de 2016. Recuperado de http://www.academia.edu/4562806/Art%C3%ADculo_de_Revisi%C3%B3n_TRANSFORMACI%C3%93N_DE_TERPENOS_EN_PRODUCTOS_QU%C3%8DMICOS_FINOS

Vega, E., López, A. (2009). Agentes antimicrobianos presentes en especias e hierbas. Revisado: 23 de Mayo de 2016. Recuperado de: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Vega-Portocarrero-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Vega-Portocarrero-et-al-2009.pdf)