



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto  
Politécnico Nacional**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Purificación con *Moringa oleifera* de un agua residual pretratada de la zona  
chinampera de la Ciudad de México**

**M.en T. del Agua Nury Gineth Infante González**

**Directora de tesis**

**Dra. Refugio Rodríguez Vázquez**

**TESIS**

**Para obtener el grado de:**

**Doctor en Ciencias en la especialidad de Biotecnología y Bioingeniería**

**Ciudad de México, Noviembre de 2021**

## **Agradecimientos**

A las siguientes instituciones:

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT):

Beca N° 3006060

Beca Mixta N° 291250

Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares CINVESTAV-IPN  
Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales” (LaNSE) CINVESTAV-IPN

Universidad Politécnica de Cataluña

UNESCO Chair on Sustainability and Health and Environmental  
Microbiology

The Environmental Pollution Control Laboratory (INTEXTER) at the Polytechnic  
University of Catalonia

Laboratory, Universitat Politècnica de Catalunya-Barcelona Tech, Edifici Gaia  
Department of Genetics and Microbiology Faculty of Biosciences,  
Universitat Autònoma, Barcelona, Spain  
Institut of Marine Science (CSIC) Barcelona

## **Agradecimientos técnicos**

A la MSc. Angie Johanna Torre Pedraza, M.I. Katerine Vera, M.I. Maria Paula Vargas y la Lic. En Biotecnología Yareth por su apoyo técnico en el trabajo de laboratorio de Xenobióticos para los análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

Al Dr. Daniel Estrada por los análisis de identificación y secuenciación molecular.

A la Dra. Isabel Sanz-Saenz y la MSc. Eva Forés Gil por la asistencia técnica y orientación de los protocolos en los análisis moleculares.

A la Dra. Yaneth Bartolo por la asistencia técnica en el protocolo de clonación y análisis moleculares.

A la coordinación del departamento por el apoyo con la gestión a tiempo para facilitar los trámites y los recursos para la realización de la estancia internacional.

Al comité tutorial por su guía y apoyo en el desarrollo del proyecto por los conocimientos y paciencia otorgada en este proceso de aprendizaje.

A la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por brindarme la oportunidad, apoyo incondicional y orientación en cada etapa del proyecto.

Al Dr. Jordi Morató por darme la oportunidad de realizar parte de mi trabajo experimental en la Cátedra UNESCO de Sostenibilidad y siempre confiar en mis habilidades profesionales.

A Edgar Palacios por su apoyo en el trabajo de campo y su gran amistad incondicional.

## **Dedicatoria**

A Dios por su gran demostración de amor recordándome sus promesas

A la Santísima Virgen de Guadalupe por hacer este sueño realidad

A mi madre llenándome de fortaleza con sus recuerdos y enseñanzas

A mi padre por su amor incondicional en los buenos y malos momentos

A mis hermanos porque siempre hemos estado juntos y porque siempre hemos  
salido adelante

A mi mejor amiga Dianis por siempre estar ahí cuando más la necesito

A todas aquellas amistades que me dieron calma en todos los momentos de angustia  
y siempre me desearon lo mejor

A mi país Colombia para que algún día pueda valorar la ciencia y el sacrificio de un  
investigador en el extranjero

## CONTENIDO

<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>2 GENERALIDADES.....</b>	<b>24</b>
2.1. La contaminación de las aguas residuales.....	25
2.2. Contaminación de las aguas, contaminantes en la Zona Chinampera, plaguicidas y tratamientos convencionales de remediación.....	26
2.2.1. Importancia del agua y sus principales factores de contaminación.....	26
2.2.2. Principales contaminantes de las aguas residuales.....	27
2.2.3. Impacto de los plaguicidas y microorganismos patógenos en el ambiente, la salud y la Zona Chinampera.....	30
2.2.4. Impacto Ambiental del Endosulfán en el medio ambiente.....	36
2.2.5. Impacto de los plaguicidas en el medio ambiente y la Zona Chinampera.	37
2.3. Tecnologías de biorremediación utilizando biosurfactantes.....	39
2.3.1. Biosurfactantes de origen vegetal.....	42
2.4. Tecnologías de biorremediación utilizando extractos naturales de origen vegetal.....	44
2.4.1. <i>Moringa oleifera</i> y sus aplicaciones en el tratamiento de aguas.....	45
2.5. Tecnologías de bioremediación de aguas residuales utilizando biofiltros y microorganismos.....	47
2.6. Tecnologías de biofiltros utilizando como material filtrante el corcho en humedales para remoción de contaminantes.....	49
2.7. Tecnologías de biofiltros utilizando como material filtrante el corcho en humedales para remoción de contaminantes.....	51
2.8. Técnicas moleculares convencionales y para determinar la viabilidad celular.....	52
2.8.1. Técnica molecular qPCR a tiempo real.....	53
2.8.2. VqPCR.....	54
2.8.3. Técnica live/dead INVITROGEN.....	56
2.8.4. Técnica de citometría de flujo.....	57
2.9. Aplicación Biotecnológica: Sistema de filtración con hidroponía para purificación de agua.....	58
2.9.1. Tratamiento de aguas residuales para riego agrícola.....	58
2.9.2. Sistema de tratamiento de hidroponía.....	60
2.9.3. Capacidad del sistema en la eliminación de contaminantes.....	61

2.9.4.	Clasificación de sistemas hidropónicos para el tratamiento de aguas residuales.....	62
2.9.5.	Selección de sustrato.....	63
2.9.6.	Selección de cultivos.....	64
2.9.7.	Efectividad de la hidroponía para el tratamiento de aguas residuales y sistema de crecimiento vegetal.....	65
2.9.8.	Eliminación de contaminantes orgánicos y patógenos.....	66
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>70</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
5.1.	Objetivo General.....	71
5.2.	Objetivos Específicos.....	71
<b>6.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>72</b>
6.1.	Evaluación del efecto de la actividad tensoactiva y emulsificante del extracto de la semilla de <i>M. oleifera</i> .....	73
6.1.1.	Recolección de las semillas y preparación de los extractos de <i>M. oleifera</i> .....	73
6.1.2.	Evaluación de la concentración micelar crítica (CMC) para seleccionar la mejor dosis según la actividad emulsificante de <i>M. oleifera</i> .....	74
6.1.3.	Capacidad emulsificante de los extractos de <i>M. oleifera</i> .....	75
6.2.	Diseño de experimentos.....	75
6.2.1.	Diseño de Experimentos para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la semilla de <i>M. oleifera</i> y preparación de las soluciones	76
6.2.2.	Factores dependientes del diseño de experimentos.....	78
6.2.2.1.	Cuantificación de proteínas totales.....	78
6.2.2.2.	Cuantificación de azúcares totales.....	78
6.2.2.3.	Medición de parámetros fisicoquímicos.....	79
6.2.2.4.	Tensión superficial.....	79
6.2.2.5.	Actividad emulsificante.....	79
6.2.3.	Análisis Estadístico.....	79
6.3.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de <i>M. oleifera</i> sobre <i>E. coli</i> .....	81
6.3.1.	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> .....	83

6.3.2.	Identificación molecular de una cepa presuntiva de <i>E. coli</i> recolectada de los canales de agua de la Zona Chinampera.....	83
6.3.3.	Confirmación de la lisis celular de <i>E. coli</i> .....	84
6.3.4.	Ensayo de desinfección con <i>M. oleifera</i> y determinación de la viabilidad celular mediante vqPCR.....	85
6.3.5.	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las semillas de <i>M. oleifera</i> con y sin extracción del aceite sobre <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas auroginosa</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus epidermis</i> .....	87
6.4.	Sistema de biofiltración.....	88
6.4.1.	Preparación del material filtrante (corcho).....	88
6.4.2.	Proceso de funcionalización del extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> con corcho.....	88
6.5.	Diseño experimental fraccionado 2 <sup>7-4</sup> utilizando corcho como material filtrante.....	89
6.6.	Prueba de confirmación de lisis celular bacteriana.....	93
6.6.1.	Prueba live/dead INVITROGEN.....	93
6.6.2.	Prueba citometría de flujo.....	94
6.6.3.	VqPCR de viabilidad de las concentraciones seleccionadas de las pruebas del extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> con y sin aceite e infusión de las hojas sobre la inhibición de <i>E. coli</i> .....	94
6.6.3.1.	Identificación molecular de la cepa presuntiva de <i>E. coli</i> .....	94
6.6.3.2.	Selección del gen de <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	95
6.6.3.3.	Extracción del ADN.....	95
6.6.3.4.	Amplificación del gen LacZ.....	98
6.6.3.5.	Condiciones de la PCR para el gen LacZ.....	99
6.6.3.6.	Condiciones para la preparación de la mix de PCR.....	99
6.6.3.7.	Procedimiento de la PCR para 16S ARNr.....	101
6.6.3.8.	Concentración de la muestra y tratamiento con el PMA.....	101
6.6.3.9.	Evaluación de la eficiencia de biofiltros funcionalizados del extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> con corcho para la eliminación de <i>E. coli</i> .....	102
6.7.	Preparación y reconstitución con PMA.....	102
6.7.1.	Controles de ensayo relevantes.....	103
6.7.2.	Procedimiento 1 - preparación de controles.....	104
6.7.4.	Ensayo de viabilidad (vqPCR) con tratamiento de PMA.....	106
6.7.5.	VqPCR (Extracción de DNA).....	107

6.7.6.	Amplificación del gen del ADN.....	107
6.7.7.	qPCR: PCR en tiempo real.....	110
6.7.8.	Mix de sistemas de fluorescence.....	110
6.7.9.	Cuantificación Absoluta.....	110
6.7.10.	Procedimiento de la qPCR.....	111
6.8.	Evaluación del efecto de <i>M. oleifera</i> en la remoción de plaguicidas de un agua sintética.....	115
6.8.1.	Determinar el efecto de los extractos de <i>M. oleifera</i> sobre los ensayos de biodegradabilidad del endosulfán por <i>P. putida</i> simulando las condiciones de la zona Chinampera.....	116
6.8.2.	Cinética de crecimiento de <i>P. putida</i> .....	117
6.8.3.	Caracterización morfológica de la cepa de <i>P. putida</i> CDBB-B-100.....	117
6.9.	Diseño experimental y parámetros evaluados.....	118
6.9.1.	Preparación del extracto de semillas de <i>M. oleifera</i> .....	118
6.10.	Diseño dosis respuesta.....	119
6.10.1.	Determinación de la capacidad de emulsificante.....	120
6.10.2.	Determinación de la tensión superficial.....	120
6.10.3.	Ensayos de biodegradabilidad.....	120
6.10.4.	Pruebas de biodegradabilidad del plaguicida.....	121
6.11.	Postratamiento con <i>M. oleifera</i> del agua de un apantle de la zona chinampera.....	123
6.11.1.	Caracterización del agua de la chinampa.....	123
6.11.2.	Instalación del biofiltro.....	127
6.11.3.	Funcionalización del material filtrante utilizando el extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> .....	127
6.11.4.	Diseño de Experimentos para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la semilla de <i>M. oleifera</i> funcionalizado en el material filtrante.....	130
6.11.5.	Instalación del sistema de purificación.....	131
6.11.6.	Limpieza del Sistema Hidropónico.....	131
6.11.7.	Montaje inicial de la tecnología del sistema de hidroponía.....	132
6.11.8.	Evaluación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del canal.....	133
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>134</b>



7.1.	Evaluación de las características surfactantes.....	134
7.1.1.	Concentración micelar crítica (CMC) para seleccionar la mejor dosis según la actividad emulsificante de <i>M. oleífera</i> .....	134
7.1.2.	Efecto del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> sobre la tensión superficial, actividad emulsificante, conductividad, pH y oxígeno disuelto.....	137
7.2.	Caracterización morfológica de una cepa presuntiva de <i>E. coli</i> aislada de un canal de Xochimilco.....	140
7.2.1.	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> aislada de un canal de Xochimilco.	142
7.2.2.	Análisis molecular de <i>E. coli</i> .....	143
7.2.3.	Selección de las condiciones experimentales para la inhibición de <i>E. coli</i> .....	145
7.2.4.	Correlación entre la Tensión superficial, emulsificación y la inhibición de <i>E. coli</i> .....	148
7.2.5.	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar el efecto inhibitorio de las semillas sin extraer el aceite sobre <i>E. coli</i> .....	150
7.2.6.	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar el efecto inhibitorio de las semillas con la extracción del aceite sobre <i>E. coli</i> .....	153
7.3.	Funcionalización del soporte.....	155
7.3.1.	Extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> con grava sobre la inhibición celular de <i>E. coli</i> .....	155
7.3.2.	Reducción de <i>E. coli</i> con el biofiltro funcionalizado con el extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> utilizando corcho como material filtrante.....	158
7.4.	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> sobre <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas auroginosa</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus epidermis</i> .....	160
7.5.	Estandarización de la técnica molecular qPCR de viabilidad para evaluar la eficiencia del sistema de biofiltros con corcho funcionalizados del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> sobre la inhibición de <i>E. coli</i> .....	165
7.5.1.	Cinética de crecimiento, amplificación, clonación del gen <i>LacZ</i> y curva estándar de <i>E. coli</i> .....	165
7.5.2.	Amplificación del gen 16S y <i>LacZ</i> .....	166
7.5.3.	Curvas estándar del gen <i>LacZ</i> .....	167
7.5.4.	Ensayo vqPCR del gen <i>LacZ</i> .....	169
7.5.5.	Ensayo de viabilidad bacteriana de LIVE / DEAD utilizando grava como material filtrante.....	177

7.5.6.	Ensayo de viabilidad bacteriana de LIVE / DEAD utilizando corcho como material filtrante.....	179
7.5.7.	Citometría de flujo.....	181
7.6.	Evaluación del efecto del extracto de la semilla de <i>M. oleifera</i> en la remoción de endosulfán.....	183
7.6.1.	Caracterización morfológica de <i>P. putida</i> .....	183
7.6.2.	Curva de crecimiento de <i>P. putida</i> .....	185
7.6.3.	Cinética <i>P. putida</i> vs el extracto de semillas de <i>Moringa oleífera</i> .....	186
7.6.4.	Cinética <i>P. putida</i> Vs Endosulfán.....	187
7.6.5.	Cinética <i>P. putida</i> vs extractos de <i>Moringa oleifera</i> y endosulfán.....	188
7.6.6.	Tensión superficial.....	189
7.6.7.	Índice de Emulsificación.....	190
7.7.	Prueba de biodegradabilidad de plaguicidas mediante respirometría electrolítica.....	191
7.8.	Aplicación Biotecnológica.....	195
7.8.1.	Seguimiento del funcionamiento del sistema hidropónico.....	196
7.8.2.	Estado del sistema después de 3 meses.....	201
	<b>8.CONCLUSIONES.....</b>	<b>206</b>
	<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>208</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contaminantes de las aguas residuales sus fuentes potenciales y efectos significativos.....	28
<b>Tabla 2.</b> Características de plaguicidas organoclorados según su estructura, toxicidad LD 50, uso, persistencia en el medio ambiente, clasificación según la OMS y el efecto bioquímico en la salud humana.....	33
<b>Tabla 3.</b> Biosurfactantes derivados de microorganismos.....	41
<b>Tabla 4.</b> Tipo de biosurfactantes de origen vegetal según su clase, fuente y aplicación.....	44
<b>Tabla 5.</b> Diseño factorial fraccionado $2^{6-3}$ para la reducción de microorganismos patógenos y remoción de plaguicidas.....	76
<b>Tabla 6.</b> Interacciones del diseño factorial fraccionado $2^{6-3}$ entre los niveles de los factores independientes con un total de 8 tratamientos y 24 experimentos por triplicado.....	77
<b>Tabla 7.</b> Soluciones para evaluar el efecto del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> en la reducción de <i>E. coli</i> .....	77
<b>Tabla 8.</b> Interpretación del análisis estadístico.....	80
<b>Tabla 9.</b> Factores independientes y sus valores bajo y alto del diseño factorial fraccionado $2^{7-4}$ para la reducción de <i>E. coli</i> en los biofiltros percoladores funcionalizados con el extracto de <i>M. oleífera</i> .....	90
<b>Tabla 10.</b> Matriz del Diseño experimental fraccionado $2^{7-4}$ .....	90
<b>Tabla 11.</b> Secuencia de primers gen <i>LacZ</i> .....	99
<b>Tabla 12.</b> Reactivos necesarios indicados para elaborar el mix:.....	100
<b>Tabla 13.</b> Reactivos necesarios indicados para elaborar el mix:.....	100
<b>Tabla 14.</b> Primers utilizados para la amplificación del gen 16S ARNr y longitud del amplicón.....	101
<b>Tabla 15.</b> Reactivos necesarios indicados para elaborar el mix:.....	101

<b>Tabla 16.</b> Reactivos del KIT PMA Viality blue-V.....	100
<b>Tabla 17.</b> Ensayo de viabilidad de las muestras del biofiltro con corcho funcionalizado del extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> .....	107
<b>Tabla 18.</b> Etapas de un ciclo de PCR.....	108
<b>Tabla 19.</b> Reactivos necesarios indicados para elaborar la mix:.....	111
<b>Tabla 20.</b> Características del gen <i>LacZ</i> de <i>E. coli</i> ATCC 8709.....	112
<b>Tabla 21.</b> Concentraciones de trabajo de los primers, partiendo de una solución madre de ambos primers de concentración 100 µM.....	112
<b>Tabla 22.</b> Volúmenes para un capilar, se multiplica por el número de capilares que se van a usar para saber el volumen total de la mix.....	112
<b>Tabla 23.</b> Ciclos de temperaturas para el gen <i>LacZ</i> y el modo de análisis.....	114
<b>Tabla 24.</b> Tratamientos resultantes del diseño dosis respuesta.....	119
<b>Tabla 25.</b> Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.....	124
<b>Tabla 26.</b> Factores independientes y sus valores bajo y alto del diseño factorial fraccionado $2^{7-4}$ para la reducción de <i>E. coli</i> en los biofiltros percoladores funcionalizados con el extracto de <i>M. oleifera</i> .....	130
<b>Tabla 27.</b> Matriz del diseño factorial fraccionado $2^{7-4}$ para la reducción de <i>E. coli</i> en los biofiltros percoladores funcionalizados con el extracto de <i>M. oleifera</i> .....	131
<b>Tabla 28.</b> Evaluación de las características de la tensión superficial y la capacidad emulsificante del extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> .....	137
<b>Tabla 29.</b> Efecto del extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> sobre las variables de respuesta del diseño factorial fraccionado $2^{6-3}$ .....	139
<b>Tabla 30.</b> Características macroscópicas y microscópicas de <i>E. coli</i> .....	141
<b>Tabla 31.</b> Concentración y pureza obtenida de las extracciones de la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	166
<b>Tabla 32.</b> Concentración y pureza obtenida de las extracciones de las diluciones enserie para la realización de la curva estándar de la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 8739 mediante Qubit.....	168
<b>Tabla 33.</b> Efecto del sistema de biofiltración sobre <i>E. coli</i> en el tiempo inicial (0 horas) utilizando vqPCR con y sin PMA.....	170

<b>Tabla 34.</b> Efecto del sistema de biofiltración sobre <i>E. coli</i> en el tiempo final (6 horas) utilizando vqPCR con y sin PMA.....	172
<b>Tabla 35.</b> Evaluación cuantitativa del gen <i>LacZ</i> con y sin PMA mediante vqPCR. .....	176
<b>Tabla 36.</b> Evaluación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la Chinampa Aurora.....	19698
<b>Tabla 37.</b> Medición de parámetros fisicoquímicos después de 3 meses de funcionamiento del sistema.....	203
<b>Tabla 38.</b> Cuantificación de <i>E. coli</i> en cultivo de lechuga del sistema hidropónico..	204

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo del funcionamiento del PMA.....	555
<b>Figura 2.</b> Patrones de fluorescencia de células sanas, muertas y lesionadas teñidas con yoduro de propidio y SYTO 9 (kit LIVE/DEAD).....	57
<b>Figura 3.</b> Esquema general de la metodología experimental.....	72
<b>Figura 4.</b> Selección de <i>M. oleífera</i> y semillas tamizadas para la preparación de los extractos. Plantaciones de Moringa del campo experimental San Miguel Arcángel (a); hojas pinnadas y frutos (b); fruto seco como capsula leñosa y seca(c); semillas con un diámetro de 1.5-3 cm de diámetro con un centro de color café oscuro y 3 alas de color beige (d); semillas sin cascara de color blanco crema (e); semillas tamizadas (f).....	74
<b>Figura 5.</b> Hojas y semillas de <i>M. oleífera</i> .....	85
<b>Figura 6.</b> Proceso de extracción de aceite de la semilla.....	86
<b>Figura 7.</b> Funcionalización del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> con corcho...	87
<b>Figura 8.</b> Proceso de recolección de biomasa del corcho para proceso de extracción de ADN. Corcho con biomasa de <i>E. coli</i> (a); centrifugación de la biomasa (b); recolección de la biomasa (c); extracción y purificación del DNA (d); capilares para la prueba qPCR (e).....	89
<b>Figura 9.</b> Sistema de biofiltración utilizando cartuchos de PVC.....	90
<b>Figura 10.</b> Esquema del sistema de biofiltración funcionalizado con extracto de semillas de <i>M. oleífera</i> . Experimentos con bomba de aire (a); sistema de recirculación del agua (b).....	90
<b>Figura 11.</b> Filtración, fijación de las células bacterianas con la tinción SYTO9 y yoduro de propidio. ....	91
<b>Figura 12.</b> Primers forward y reverse del gen <i>LacZ</i> .....	95
<b>Figura 13.</b> Proceso de extracción de ADN de <i>E. coli</i> .....	98
<b>Figura 14.</b> Proceso de amplificación del gen <i>LacZ</i> . Cuantificación del ADN (a); Amplificación del gen (b); Electroforesis en gel de agarosa (c); Foto documentador de geles (d).....	99

<b>Figura 15.</b> Ejemplo de diagrama de amplificación de máxima eficiencia de enmascaramiento de PMA.....	102
<b>Figura 16.</b> Sistema BLU-V de iluminación de muestras con PMA.....	104
<b>Figura 17.</b> Representación de la amplificación de una curva estándar.....	107
<b>Figura 18.</b> Esquema del proceso del ensayo de desinfección con el extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> .....	109
<b>Figura 19.</b> Ensayo de biodegradabilidad mediante respirometro electrolítico.....	106
<b>Figura 20.</b> Esquema del biofiltro percolador.....	128
<b>Figura 21.</b> Funcionalización de la gravilla con el extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> para la reducción de <i>E. coli</i> .....	129
<b>Figura 22.</b> Sistema de hidroponía NFT, sistema de filtración con grava (A); sistema de filtración de corcho funcionalizado con <i>M. oleifera</i> (B).....	132
<b>Figura 23.</b> Plantas seleccionadas para el sistema de cultivo “ <i>Latucca Sativa</i> ”.....	133
<b>Figura 24.</b> Efecto del extracto de las semillas de <i>M. oleifera</i> sobre (A) la tensión superficial y la actividad del emulsificante con un (TP) tamaño de partícula de 0.86 mm por 20 min, (B) 0.86 mm por 1 hora, (C) (TP) de 2 mm por 20 min y la (D) (TP) 2 mm por 1 hora.....	134
<b>Figura 25.</b> Estabilidad de la actividad emulsificante del extracto de semillas de <i>M. oleifera</i> después de 24 horas (A) tamaño de partícula de 0.86 mm y (B) tamaño de partícula de 2 mm.....	136
<b>Figura 26.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> .....	142
<b>Figura 27.</b> Secuencia más similar de acuerdo a la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con su base de datos de secuencias del fragmento 16S ribosomal de cepas tipo.....	144
<b>Figura 28.</b> Dendograma de similitud de las secuencias analizadas (ubicada en color rojo) comparada con otras resultantes de la búsqueda BLAST, elaborado con MEGA 6.0 a través del método de Neighbor Joining (modelo T3P).....	144
<b>Figura 29.</b> Efecto de los extractos de las semillas de <i>M. oleifera</i> sobre la reducción de <i>E. coli</i> en un tiempo de 2 y 3 horas.....	146
<b>Figura 30.</b> Correlación del índice de emulsificación y la reducción de <i>E. coli</i> .....	149

<b>Figura 31.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> a diferentes concentraciones sobre <i>E. coli</i> utilizando con la prueba de microgota para observar viabilidad en placa.....	151
<b>Figura 32.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> a diferentes concentraciones sobre <i>E. coli</i> con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.....	152
<b>Figura 33.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> a diferentes concentraciones sobre <i>E. coli</i> mediante la prueba de microgota para observar viabilidad en placa.....	153
<b>Figura 34.</b> Determinación de la inhibición de <i>E. coli</i> a diferentes concentraciones del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> sin aceite.....	154
<b>Figura 35.</b> Determinación de la inhibición de <i>E. coli</i> a diferentes concentraciones del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> sin aceite utilizando etanol como disolvente. .....	154
<b>Figura 36.</b> Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> utilizando los biofiltros utilizando soporte de gravilla funcionalizados con los extractos de <i>M. oleífera</i> .....	156
<b>Figura 37.</b> Inhibición de <i>E. coli</i> con el sistema de biofiltración de vidrio con una concentración las semillas de Moringa del 5%.....	157
<b>Figura 38.</b> Inhibición de <i>E. coli</i> con el sistema de biofiltración con cartuchos de PVC con una concentración las semillas de <i>M. oleífera</i> del 30%.....	158
<b>Figura 39.</b> Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> utilizando corcho funcionalizados con el extracto de <i>M. oleífera</i> .....	159
<b>Figura 40.</b> Cinética de crecimiento con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.....	161
<b>Figura 41.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> a diferentes concentraciones sobre <i>S. epidermis</i> con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.....	162
<b>Figura 42.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> a diferentes concentraciones sobre <i>P. aeruginosa</i> con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.....	163
<b>Figura 43.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> a diferentes concentraciones sobre <i>E. coli</i> con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.....	164



<b>Figura 44.</b> Cinética de crecimiento de la cepa de <i>E. coli</i> .....	165
<b>Figura 45.</b> Amplificación del gen 16S ARNr; a. Escala estándar de ADN; b. Electroforesis del gen 16S ARNr; Electroforesis del gen <i>LacZ</i> de <i>E. coli</i> ATCC 8739. ....	167
<b>Figura 46.</b> Curva Estándar del gen <i>LacZ</i> .....	169
<b>Figura 47.</b> Número de copias de gen respecto ng ADN.....	172
<b>Figura 48.</b> Número de copias del gen con respecto a $\mu\text{L}$ de ADN presente en el sistema de biofiltración utilizando el tratamiento 2 a las 6 horas.....	174
<b>Figura 49.</b> Prueba LIVE/DEAD con microscopia de fluorescencia (SEM) de las muestras del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> funcionalizadas. Biofiltro inicial sin funcionalizar (A), Biofiltro funcionalizado en material filtrante grava a las 2 horas de tratamiento (B).....	178
<b>Figura 50.</b> Prueba live/dead con microscopía de fluorescencia (SEM) de las muestras del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> funcionalizadas en corcho. Biofiltro inicial sin funcionalizar (A), Biofiltro funcionalizado en material filtrante de corcho a las 6 horas de tratamiento (B).....	180
<b>Figura 51.</b> Diagrama de dispersión de ángulo de las muestras del extracto de las semillas de <i>M. oleífera</i> funcionalizadas en corcho. Biofiltro inicial sin funcionalizar a las 6 horas (a), Biofiltro con corcho funcionalizado a las 6 horas de tratamiento (R1) (b). Réplicas del tratamiento (c) y (d).....	182
<b>Figura 52.</b> Caracterización macroscópica y microscopía de <i>P. putida</i> .....	186
<b>Figura 53.</b> Secuencia más similar de acuerdo a la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con su base de datos de secuencias del fragmento 16S ribosomal de cepas tipo.....	185
<b>Figura 54.</b> Cinética de crecimiento de <i>P. putida</i> .....	186
<b>Figura 55.</b> Cinética de <i>Moringa oleífera</i> y <i>P. putida</i> .....	187
<b>Figura 56.</b> Cinética de <i>P. putida</i> en presencia de Endosulfán adicionando en el tiempo 0 y a la hora 5.....	188
<b>Figura 57.</b> Cinética de <i>P. putida</i> en presencia de Endosulfán y extracto de <i>M. oleífera</i> adicionado en el tiempo 0 y 5 horas respectivamente.....	189

<b>Figura 58.</b> Disminución de la tensión superficial en presencia del extracto de <i>M. oleifera</i> y <i>P. putida</i> .....	190
<b>Figura 59.</b> Índice de emulsificación de los tratamientos evaluados.....	191
<b>Figura 60.</b> Biodegradabilidad de metalaxyl por <i>P. putida</i> . MSD (medio mineral sin dextrosa), MD (medio mineral con dextrosa).....	192
<b>Figura 61.</b> Biodegradabilidad de endosulfan por <i>P. putida</i> . MSD (medio mineral sin dextrosa), MD (medio mineral con dextrosa).....	193
<b>Figura 62.</b> Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Endosulfan sobre <i>P. putida</i> con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN. ....	195
<b>Figura 63.</b> Efecto de los sólidos disueltos totales en el sistema NFT.....	197
<b>Figura 64.</b> Efecto de la conductividad en el sistema NFT.....	200
<b>Figura 65.</b> Efecto del sistema NFT sobre el oxígeno disuelto.....	199
<b>Figura 66.</b> Efecto Redox en el sistema.....	200
<b>Figura 67</b> Efecto del pH en el sistema hidropónico.....	201
<b>Figura 68.</b> Sistema hidropónico NFT (a); Biofiltro secundario (b).....	201
<b>Figura 69.</b> Estado de las plantas, Sección inicial del sistema con alta abundancia de raíces (a); Sección media del sistema con escasas raíces (b).....	202
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo 1.</b> Resultados estadísticos del efecto del extracto de las semillas sobre la tensión superficial, actividad emulsificante, oxígeno disuelto, conductividad, pH, actividad antimicrobiana, azúcares totales y proteínas solubles.....	232
<b>Anexo 2.</b> Congresos y cursos.....	232
<b>Anexo 3.</b> Artículo publicado.....	233

## RESUMEN

La Zona Chinampera ha sido catalogada como ejemplo de biodiversidad endémica, agrícola y Patrimonio Natural y Cultural de la Humanidad por la UNESCO desde 1987. El agua es el elemento fundamental para el correcto funcionamiento de los ecosistemas y de la zona chinampera como el recurso hídrico esencial para el riego de los cultivos y el único sustento económico para la mayoría de los chinamperos. Sin embargo, el agua de los canales se encuentra contaminada con microorganismos patógenos, disruptores endócrinos (entre ellos los plaguicidas organoclorados), metales pesados y con alta salinidad debido a las actividades agrícolas tradicionales entre otros aspectos.

En este trabajo se evaluaron las propiedades del extracto de las semillas de *Moringa oleifera* (MoSe) con características tensoactivas y emulsificantes y la concentración mínima inhibitoria (CMI) relacionadas en la inhibición de microorganismos patógenos. Se utilizó *Pseudomona putida* (*P. putida*) como microorganismo modelo que degrada compuestos orgánicos; Endosulfán fue utilizado como modelo de plaguicida organoclorado. Así mismo, se determinó la eficiencia del sistema de biofiltración con la proteína activa de MoSe inmovilizada en materiales porosos mediante ensayos de viabilidad celular con la prueba LIVE/DEAD y citometría de flujo, la técnica molecular vqPCR real time se estandarizó con un gen específico y consecutivo (*LacZ*) para confirmar la viabilidad de *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 8739 de gran importancia clínica.

Adicionalmente, se desarrolló una aplicación biotecnológica con biofiltros funcionalizados con MoSe acoplado a un sistema de hidroponía como tratamiento terciario en un canal de la zona chinampera para el mejoramiento de la calidad de agua. Con base en los resultados, se evidenció el efecto de las características tensoactivas de MoSe obteniendo una concentración micelar crítica (CMC) de 700 y

1500 mg/L con  $\Delta TS = 18$  y  $20 \text{ mN /m}$  y ( $E_{24}\%$ ) de 30 y 40%, respectivamente. Ambos con un tamaño de partícula de 0.86  $\mu\text{m}$  de la semilla. Adicionalmente, La funcionalización de *MoSe* en corcho aumentó el potencial de actividad antimicrobiana y redujo eficazmente el crecimiento de *E. coli* con un porcentaje  $>99.99\%$ .

La técnica vqPCR fue altamente determinante para evidenciar el efecto de funcionalización de *MoSe* con el porcentaje (%vqPCR) viables a un tiempo de 6 horas con un valor de 0.024 y 0.005% de microorganismos viables. Así mismo, la producción de biosurfactantes por *P. putida* no fue afectada en presencia de endosulfán. Finalmente, la aplicación biotecnológica de biofiltros funcionalizados con *MoSe*, mejoró la clarificación del agua y la reducción *E. coli* con un valor de  $<10^1$  UFC/mL.

## **ABSTRACT**

The Chinampera Zone has been cataloged as an example of endemic, agricultural biodiversity and Natural and Cultural Heritage of Humanity by UNESCO since 1987. Water is the fundamental element for the proper functioning of ecosystems and the Chinampera zone as the essential water resource for the irrigation of the crops and the only economic sustenance for the majority of the chinamperos. However, the water in the canals is contaminated with pathogenic microorganisms, endocrine disruptors (including organochlorine pesticides), heavy metals and high salinity, due to traditional agricultural activities, among other aspects.

In this work, the properties of the *Moringa oleifera* seed extract (*MoSe*) with surfactant and emulsifying characteristics and the minimum inhibitory concentration (MIC) related to the inhibition of pathogenic microorganisms were evaluated. *Pseudomonas putida* (*P. putida*) was used as a model microorganism that degrades organic compounds; Endosulfan was used as a model organochlorine pesticide. Likewise, the efficiency of the biofiltration system with the active protein of *MoSe* immobilized in porous materials was determined by means of cell viability tests with the LIVE / DEAD

test and flow cytometry, the molecular technique vqPCR real time was standardized with a gene specific and consecutive (LacZ) to confirm the viability of *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 8739 of great clinical importance.

Additionally, a biotechnological application was developed with functionalized biofilters with *MoSe* coupled to a hydroponic system as a tertiary treatment in a canal in the chinampera area to improve water quality. Based on the results, the effect of the surfactant characteristics of (*MoSe*) was evidenced, obtaining a critical micellar concentration (CMC) of 700 and 1500 mg/L with  $\Delta TS = 18$  and 20 mN / m and ( $E_{24}\%$ ) of 30 and 40%, respectively. Both with a particle size of 0.86  $\mu$ m from the seed. Additionally, the functionalization of *MoSe* in cork increased the potential of antimicrobial activity and effectively reduced the growth of *E. coli* with a percentage > 99.99%

The vqPCR technique was highly determinant to show the effect of functionalization of *MoSe* with the percentage (% vqPCR) viable at a time of 6 hours with a value of 0.024 and 0.005% of viable microorganisms. Likewise, the production of biosurfactants by *P. putida* was not affected in the presence of endosulfan. Finally, the biotechnological application of biofilters functionalized with *MoSe*, improved the clarification of the water and the reduction of *E. coli* with a value of <101 CFU / mL.

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua es un desafío global que ha aumentado en los países desarrollados y en vía de desarrollo. Los asentamientos humanos, la industria y la agricultura son las principales causas de la contaminación ambiental, y las actividades agrícolas representan el 70% de la extracción de agua en todo el mundo, generando grandes cantidades de descargas de aguas residuales que contienen agroquímicos, materia orgánica, sedimentos, sales y microorganismos patógenos en ríos y lagos (FAO 2017a).

La zona Chinampera se encuentra ubicada en la Ciudad de México y es considerada como un sistema agrícola prehispánico. Fue catalogado como Patrimonio Natural y Cultural de la Humanidad por la UNESCO en 1987 y se caracterizó por tener una gran cantidad de parcelas agrícolas llamadas “Chinampas” encerradas por postes de juncos entrelazados y enmarcados por canales (FAO 2017b). Algunos estudios han reportado la presencia de microorganismos patógenos, indicadores de contaminación fecal, que afectan la calidad del agua, la seguridad alimentaria y la salud humana (Juárez-Figueroa et al. 2003). Se ha encontrado que *E. coli* de origen fecal está presente en los intestinos de los animales y es capaz de adaptarse fácilmente a cualquier tipo de entorno. Especialmente en el agua, se puede transmitir fácilmente, generando problemas de salud desde diarreas leves hasta complicaciones de salud potencialmente fatales (Amézquita-López et al. 2016).

Adicionalmente, los plaguicidas organoclorados persistentes (POC's) son productos químicos sintéticos con una amplia aplicación en las actividades agrícolas. Sin embargo, estos compuestos son conocidos por su capacidad de retención en el medio ambiente siendo considerados como Contaminantes

Orgánicos Persistentes (COP's) (EPA 2009). El endosulfán es un insecticida-acaricida organoclorado, es un ciclodieno policlorado que contiene azufre y el compuesto original técnicamente activo es una mezcla diastereomérica de dos isómeros biológicamente activos; 70%  $\alpha$ - y 30%  $\beta$ -endosulfán y está clasificado como moderadamente peligroso (grupo II) para la toxicidad aguda según la Organización Mundial de la Salud, OMS (Navarrete-Rodríguez et al. 2015).

En la zona de Chinampera se ha implementado una estrategia para la descontaminación de las aguas residuales utilizadas para el riego de cultivos de los canales (FAO 2017b). El noventa por ciento del agua es suministrado por la planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR) Cerro de la Estrella. Los coagulantes químicos como el cloruro férrico y el sulfato de aluminio se utilizan con mayor frecuencia en las plantas de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes orgánicos y la reducción de la turbidez (Lee et al. 2012; Teh et al. 2016). Estos contaminantes causan enfermedades neurodegenerativas y tienen un alto impacto ambiental, porque son compuestos persistentes, y el uso de cloro para la eliminación de patógenos también es común (De Paula et al. 2014). Por esta razón, en los últimos años, se han aplicado tecnologías sostenibles e innovadoras como soluciones basadas de la naturaleza (SBN) para abordar la calidad del agua, que es uno de los mayores desafíos en el tratamiento de aguas residuales (WWAP 2018). Entre ellos, se ha demostrado que la aplicación de coagulantes naturales y extractos de semillas de plantas para la coagulación-floculación reduce y / o neutraliza las cargas de coloides y elimina los patógenos (Choy et al. 2014).

El efecto del MoSe podría actuar como agente coagulante, como acondicionador de lodos y como agente desinfectante (Shan et al. 2016; Othmani et al. 2020). Sin embargo, no se ha evaluado los efectos biotensioactivos en la disminución de la tensión superficial del agua, lo que podría mejorar la solubilidad de los contaminantes hidrófobos, mejorar la biodisponibilidad para potencializar la biodegradabilidad de los contaminantes. Así mismo, podría mejorar la inhibición

del crecimiento de patógenos, reduciendo el impacto ambiental y de salud. Este efecto puede lograrse mediante compuestos fitoquímicos que presentan efectos biosurfactantes en las semillas de plantas (Yáñez-Ocampo et al. 2011; Nabinejad 2013; Guil-Guerrero et al. 2016).

Además, entre las tecnologías de tratamiento de agua se ha utilizado la técnica de biofiltración para eliminar patógenos, los primeros biofiltros se desarrollaron utilizando roca o escoria como medio filtrante (Durgananda et al. 2003). Adicionalmente, se han utilizado un gran número de alternativas para diseñar biofiltros como la turba, diferentes tipos de carbón, hojas de té, desperdicios de coco, mariscos, cáscara de plátano y naranja, agujas de pino, hojas de bambú y raíces de pasto, que eliminan metales pesados y microorganismos como bacterias, hongos y diferentes tipos de algas (Maurya et al. 2020).

Asimismo, existen reportes que explican que esos compuestos fitoquímicos tienen propiedades antimicrobianas capaces de reducir altas concentraciones celulares de bacterias como *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Staphylococcus* sp. (Chuo et al. 2018). Sin embargo, no ha sido elucidado el efecto biosurfactante de *MoSe* sobre la inhibición de microorganismos patógenos y como posible adyuvante en la biodegradabilidad de plaguicidas organoclorados. Por esta razón, en el presente estudio se evaluó el efecto de las características tensoactivas ( $\Delta$ ST) y emulsificantes ( $E_{24\%}$ ) de *MoSe* sobre la Inhibición de *E. coli* (*InhE*) para explicar la relación entre estas propiedades del biosurfactante con la inhibición del crecimiento celular bacteriano y en la biodegradabilidad del Endosulfán.

|  
|  
|



## **2. GENERALIDADES**

### **2.1. La contaminación de las aguas residuales**

Las aguas residuales son aquellas que han sido modificadas por actividades humanas y que por su calidad requieren un tratamiento previo antes de ser reusadas, vertidas a un cuerpo natural de agua o descargadas al sistema de alcantarillado (OEFA 2014).

Las aguas residuales se clasifican como domésticas, industriales, agrícolas y pecuarias conteniendo elementos y sustancias químicas disueltas, así como sólidos suspendidos, en concentración variable, que cuando son vertidas sin tratamiento causan la contaminación de los cuerpos de agua superficiales. Se estima que a nivel mundial entre 80 y 95% del agua residual se descarga directamente a los ríos, lagos y océanos sin recibir tratamiento previo (Conagua 2017).

Hay sobrecarga de aguas residuales en las plantas de tratamiento cuya infraestructura es insuficiente, lo cual origina que los efluentes tratados excedan los límites máximos permisibles (LMP), y no se cumplan con los estándares de calidad ambiental (ECA). Esto genera problemas ambientales como la contaminación de los cuerpos de agua y la generación de malos olores que causan conflictos con la población. Las aguas residuales descargadas a la red de alcantarillado que no son derivadas a las PTAR son vertidas sin ningún tratamiento a los cuerpos de agua natural, terrenos baldíos, o son empleadas en prácticas inadecuadas como riego de cultivos, lo que representa un riesgo para la salud y el ambiente (OEFA 2014).

## **2.2. Contaminación de las aguas, contaminantes en la Zona Chinampera, plaguicidas y tratamientos convencionales de remediación**

### **2.2.1. Importancia del agua y sus principales factores de contaminación**

El agua es una de las sustancias más abundantes en la tierra, es el elemento esencial para los seres vivos, además de proporcionar el buen funcionamiento y conservación de los ecosistemas (WWAP 2003). El acceso al agua potable y el saneamiento es imprescindible para la vida y un derecho humano reconocido. Así mismo, el agua es de vital importancia para el desarrollo sostenible y económico en el ámbito nacional, regional y local. El aumento de las demandas de una población cada vez más numerosa y una economía mundial que evoluciona rápidamente, combinado con los efectos del cambio climático, exacerbarán la dificultad del acceso al agua y al saneamiento para usos domésticos. (ONU 2021).

Desafortunadamente el acceso a más de 99% de agua superficial y subterránea no es fácil, y dependemos del 0.6% que está disponible (alrededor de 0.004% de la cantidad original) para abastecernos (Glynn y Heinke, 1999). Este pequeño porcentaje del recurso hídrico para consumo humano proviene de lagos, ríos, humedad del suelo y depósitos subterráneos relativamente poco profundos, cuya renovación es producto de la infiltración (ONU 2015). El ritmo al cual se puede utilizar esta provisión en apariencia abundante de agua dulce está limitado por la rapidez con la cual se mueve el ciclo hidrológico (Glynn y Heinke 1999). Adicionalmente, la extracción del uso del agua depende de los principales sectores económicos con mayor demanda de consumo a nivel mundial principalmente el sector agropecuario e industrial (ONU 2015).

En la actualidad las prácticas agrícolas insostenibles ponen en grave riesgo la salud humana y los ecosistemas generando la mayor fuente de contaminación debido a las descargas de grandes cantidades de agroquímicos, materia orgánica, sedimentos y

sales en los cuerpos de agua (FAO 2018). Los agrocontaminantes de mayor preocupación para la salud humana son los patógenos del ganado, los plaguicidas, los nitratos en las aguas subterráneas, los oligoelementos metálicos y los contaminantes emergentes, incluidos los antibióticos y los genes resistentes a los antibióticos excretados por el ganado (FAO 2018).

Adicionalmente, la contaminación del agua ha aumentado con el paso de los años debido al crecimiento demográfico, la expansión per cápita del consumo de materiales y energía, la falta de controles en los desechos industriales y agrícolas, la aplicación desmesurada de plaguicidas, la minería ilegal, la falta de tratamiento de las aguas residuales entre los que se encuentran nutrientes como nitrógeno y fósforo donde son transportados del suelo a las aguas superficiales y a las aguas subterráneas, ocasionando daño ambiental a través de la eutrofización y problemas directos a la salud humana por agua para consumo contaminada. Así mismo, la inadecuada implementación de las políticas y regulaciones gubernamentales, entre otros factores causantes de efectos negativos en el deterioro ambiental y en la salud humana (Rodríguez-Eugenio et al. 2019).

### **2.2.2. Principales contaminantes de las aguas residuales**

Los contaminantes que se encuentran en las descargas de las aguas residuales, principalmente son compuestos orgánicos, sustancias químicas inorgánicas, materia en suspensión, microorganismos patógenos y en los últimos años se han implementado técnicas con mayor sensibilidad para detectar los contaminantes emergentes, cuyo interés de estudio ha ido en aumento por ser compuestos que pasan inadvertidos en fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso en agua potable, estos contaminantes comprenden un amplia gama de compuestos químicos, productos farmacéuticos, plaguicidas, agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales (Englande et al. 2015; Ramírez-Malule et al. 2020). La permanencia y persistencia de estos contaminantes emergentes en los cuerpos de agua durante largos períodos de tiempo disminuye los rendimientos

agrícolas, aumenta la solubilidad y transporte de metales pesados, además de ser tóxicos para los seres vivos y promover el crecimiento desmesurado de organismos acuáticos provocados por los procesos de eutrofización (Gil et al. 2012).-

Se encuentra un gran número de contaminantes en el agua residual y algunos de ellos, así como sus posibles efectos se muestran en la Tabla 1 (Dewisme, 1997; Botello et al. 2005; Sánchez, 2006; Manahan, 2006; Osorio et al. 2011; Rasheed et al. 2019).

A continuación, en la Tabla 1 se encuentran los principales contaminantes de las aguas residuales.

**Tabla 1.** Contaminantes de las aguas residuales, sus fuentes potenciales y efectos significativos.

<b>Contaminantes del agua</b>	<b>Fuentes potenciales</b>	<b>Efectos significativos</b>
Compuestos orgánicos (Manahan, 2006; Rasheed et al. 2019)	Petróleo, gasolina, plásticos, plaguicidas, disolventes, detergentes.	Permanecen en los cuerpos de agua, por largos períodos de tiempo ya que, al ser productos fabricados por el hombre, tienen estructuras moleculares complejas difíciles de degradar por los microorganismos.
Sustancias químicas inorgánicas (Manahan, 2006; Soni et al. 2020)	Desechos industriales, fertilizantes, sales, residuos mineros.	Daños a los seres vivos, disminución de los rendimientos agrícolas y corrosión de los equipos de tratamiento de aguas residuales.
Materia en suspensión	Partículas extraídas del suelo y arrastradas	Son la mayor fuente de contaminación del agua. La

(He et al. 2019; Osorio et al. 2011)	por la escorrentía.	turbidez que provocan en el agua dificulta la vida de algunos organismos disminuyendo la producción de oxígeno y afectando la fotosíntesis.
Nutrientes (Osorio et al. 2011; Rosemarin et al. 2020)	Fertilizantes, abonos, plaguicidas.	Inducen el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos provocando la eutrofización del agua.
Microorganismos patógenos (Bacterias, virus y parásitos) (Chahal et al. 2016; Osorio et al. 2011)	Desechos humanos y animales.	Contaminación de los organismos acuáticos que pueden llegar al hombre con la cadena alimenticia causando enfermedades.
Metales pesados (Botello et al. 2005; He et al. 2019)	Desechos industriales y laboratorios químicos.	Causan daños a los seres vivos, disminuyen los rendimientos agrícolas y pueden corroer los equipos de tratamiento de aguas residuales.
Agentes quelantes (Sánchez, 2006; Mousavi y Khodadoost 2019)	Algunos detergentes y desechos industriales.	Solubilidad y transporte de metales pesados causan daños a los seres vivos, así como contaminación de los organismos acuáticos.
Grasas y aceites (Sánchez, 2006; Husain et al. 2014)	Procesado de alimentos, desechos domésticos e	Disminución de la concentración de oxígeno, liberación de olores desagradables, toxicidad para

---

### **2.2.3. Impacto de los plaguicidas y microorganismos patógenos en el ambiente, la salud y la Zona Chinampera**

Los plaguicidas son los principales productos químicos empleados por el hombre para el control de plagas, que contribuyen a una mayor producción y calidad de los cultivos, como la prevención de enfermedades mediante el control de vectores (Ortiz et al. 2014). Según los reportes realizados por Mansour (2004) y Martínez et al. (2007) indican que los plaguicidas se caracterizan por ser compuestos de alta agresividad y tóxicos para el ser humano, así mismo, la producción y vertimiento al medio ambiente de estos plaguicidas genera altos índices de contaminación directa e indirectamente en el aire, suelo, agua y alimentos.

Las plaguicidas son un grupo de productos químicos utilizados principalmente en el sector agrícola para la destrucción de insectos, malezas, hongos, bacterias, etc. Y se pueden clasificar según su naturaleza química (organoclorados, organofosforados, etc.), requisitos de aplicación (agricultura, salud pública, doméstico), organismo objetivo o uso específico (insecticida, herbicida, fungicida, etc.) (Ravindran et al. 2016).

Los plaguicidas organoclorados son un grupo de compuestos clorados ampliamente que pertenecen a la clase de contaminantes orgánicos persistentes en el medio ambiente. Las estadísticas muestran que el 40% de todos los plaguicidas utilizados pertenecen a la clase de sustancias químicas organocloradas debido a su bajo costo y su uso contra diversas plagas. (Ravindran et al. 2016). A continuación, en la Tabla 2 se observa las características principales de cada plaguicida organoclorado según su estructura, toxicidad LD<sub>50</sub>, uso, persistencia en el medio ambiente, y un efecto bioquímico en la salud humana, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2019).

El continuo uso y exposición de plaguicidas, afecta la población que trabaja directamente en los sistemas agrícolas con altos cuadros de intoxicaciones, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Panamericana de Salud (OPS) han reportado que por año los valores oscilan entre 500,000 y 1 millón de personas afectadas (OPS 2012). Los estudios que se han realizado en la República Mexicana han evidenciado que 22 plaguicidas se han clasificado como perjudiciales para la salud y el ambiente, así mismo, se emplean 30 plaguicidas de 90 que han sido cancelados o restringidos en los EUA (INEGI 2000).

Dentro de los plaguicidas organoclorados según la OMS, clasificó al lindano y el endosulfan como plaguicida moderadamente peligroso y altamente peligroso respectivamente. Adicionalmente la alta persistencia en el medio ambiente del lindano es de 15 meses y del Endosulfan isómero alfa es de 25 días y beta de 150 días, además las trazas de estos contaminantes químicos son altamente acumulables en los depósitos y sedimentos de los ecosistemas acuáticos (Ravindran et al. 2016).

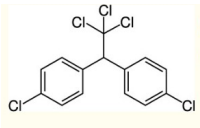
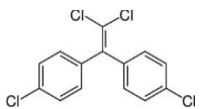
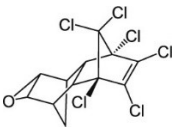
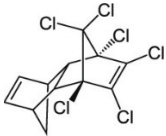
El endosulfán es un insecticida organoclorado constituido por una mezcla de los isómeros endosulfán I (alfa) y endosulfán II (beta). El endosulfán pertenece al grupo de los ciclodienos y es químicamente similar a la aldrina, al clordano y al heptacloro (González et al. 2009). El principal metabolito, el sulfato de endosulfán, puede encontrarse en el ambiente por fotólisis del endosulfán o como resultado de la oxidación de éste por microorganismos. Otros productos de degradación incluyen; endosulfán diol, endosulfán lactona, endosulfán éter, endosulfán hidroxietar, endosulfán ácido carboxílico (González et al. 2009).

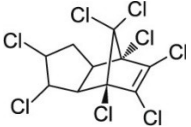
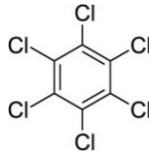
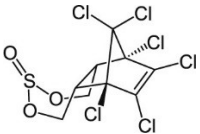
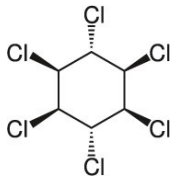
El endosulfán tiene elevada toxicidad aguda y su metabolización ocurre de manera rápida, pero su principal metabolito oxidado, el sulfato de endosulfán, presenta una toxicidad aguda, equivalente a la del compuesto original. El modo de acción del endosulfán es por interacción antagónica no competitiva con los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el cerebro. El enlace con el receptor del GABA

induce la incorporación de iones cloruro por las neuronas, lo que provoca la hiperpolarización de la membrana. El bloqueo de esta actividad se traduce en una repolarización sólo parcial de la neurona y en un estado de excitación incontrolable (González et al. 2009).

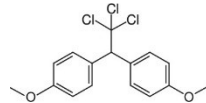


**Tabla 2.** Características de plaguicidas organoclorados según su estructura, toxicidad LD<sub>50</sub>, uso, persistencia en el medio ambiente, clasificación según la OMS y el efecto bioquímico en la salud humana.

			LD <sub>50</sub>		Ambiente	basada en LD <sub>50</sub> oral de rata	humanos
1	Diclorodifeniltricloroetano (DDT) C 14 H 9 Cl 5		Ratones Oral: 150-300 mg / kg	Insecticida, Acaricida	Alta persistencia Vida media: 2-15 años	Moderadamente peligroso	Sensación punzante de la boca, náuseas, mareos, confusión, dolor de cabeza, letargo, incoordinación, vómitos, fatiga, temblores en las extremidades, anorexia, anemia, debilidad muscular, hiperexcitabilidad, ansiedad y tensión nerviosa
2	Dicloro difenil dicloroetano (DDE)		Rata oral: 800-1240 mg / kg	Insecticida	Alta persistencia Vida media: 10 años	Ligeramente peligroso	Quiste en las manos, picazón, psoriasis, eczema, leucoderma, erupciones en la piel
3	Dieldrin C 12 H 8 Cl 6 O		Ratón Oral: 38-77 mg / kg	Insecticida	Alta persistencia Vida media: 9 meses	Altamente peligroso	Efectos neurotóxicos, reproductivos, de desarrollo, inmunológicos, genotóxicos, tumorigénicos, náuseas, vómitos, espasmos musculares y anemia aplásica
4	Aldrin C 12 H 8 Cl 6		Ratón Oral: 44 mg / kg	Insecticida	Moderada Persistencia Vida media: 4-7 años	Altamente peligroso	Efectos neurotóxicos, reproductivos, de desarrollo, inmunológicos, genotóxicos, tumorigénicos, náuseas, vómitos, espasmos musculares y anemia aplásica

5	Clordano C 10 H 6 Cl 8		Ratones Oral: 145-430 mg/kg Dérmica: 153 mg/kg	Insecticida	Alta persistencia Vida media: 10 años	Moderadamente peligroso	Convulsiones, temblor, confusión mental e incoordinación
6	Hexacloruro de benceno (BHC) C 6 H 6 Cl 6		Rata Oral: 10,000 mg / kg	Rodenticida Insecticida Acaricida	Alta persistencia Vida media: 3 - 6 años	El riesgo agudo es poco probable	Quiste en las manos, picazón, psoriasis, eczema, leucoderma, erupciones en la piel  Disminuye el recuento de glóbulos blancos y la migración de macrófagos, efectos adversos sobre el sistema inmune humoral y celular. Afecta la calidad del semen, el conteo de espermatozoides, las células espermogoniales, la morfología de los espermatozoides y otros defectos en las hormonas sexuales masculinas, Daño y mutación del ADN
7	Endosulfan C 9 H 6 Cl 6 O 3 S		Rata Oral: 18 a 220 mg / kg Dérmica: 74 mg / kg	Insecticida	Moderada Persistencia Vida media Isómero Alfa 35 días e Isómero beta 150 días	Altamente peligroso	Daña el hígado humano, los riñones, los sistemas neuronales e inmunológicos e induce defectos congénitos al cáncer, causa neurotoxicidad, toxicidad reproductiva y hepatotoxicidad.
8	Lindano C 6 H 6 Cl 6		Ratón oral: 59-246 mg / kg	Rodenticida Insecticida Acaricida	Alta persistencia. Vida media: 15 meses	Moderadamente peligroso	En ratas fertilidad reducida
9	Metoxicloro C 16 H 15 Cl		Ratones	Insecticida	Alta	El riesgo agudo	En ratas fertilidad reducida

3 O 2



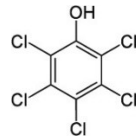
oral: 2000  
mg / kg

persistencia  
Vida media:  
<120 días

es poco probable

10

Pentaclorofenol C 6 Cl 5  
OH



Ratones  
Oral: 74-  
130 mg /  
kg

Insecticida  
Herbicida  
Fungicida

Moderada  
Persistencia  
Vida media: 45  
días

Altamente -  
Moderadamente  
peligroso

Inflamación del tracto  
respiratorio superior y  
bronquitis, efectos  
sanguíneos como anemia  
aplásica, efectos sobre el  
riñón y el hígado, efectos  
inmunológicos e irritación de  
los ojos, la nariz y la piel

---

#### **2.2.4. Impacto Ambiental del Endosulfán en el medio ambiente**

El endosulfán entra al medioambiente cuando es producido o utilizado como plaguicida y se distribuye en el aire, el agua, suelos y sedimentos. Generalmente, el endosulfán se degrada en cuestión de semanas. Sin embargo, también puede permanecer adherido a partículas de suelo por varios años sin degradarse. Según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP), reportó que este compuesto químico es relativamente resistente a la fotodegradación, pero sus metabolitos, incluyendo al sulfato de endosulfán, son susceptibles a la fotólisis (UNEP 2009).

Los estudios sugieren que la exposición al endosulfán puede resultar en riesgos agudos y crónicos preocupantes tanto para organismos acuáticos como para organismos terrestres. Es extremadamente tóxico para peces y se han demostrado efectos en la reproducción y en el desarrollo de estos organismos. También es tóxico para aves y mamíferos, así como para organismos invertebrados acuáticos. El endosulfán afecta también la fotosíntesis en algas y otras plantas acuáticas, y produce efectos fitotóxicos incluso en cultivos comerciales que han sido tratados con este plaguicida. El isómero alfa es más tóxico para el medioambiente que el isómero beta y ambos son más tóxicos que el producto grado técnico (UNEP 2009).

Los valores de bioacumulación reportados varían desde 20 hasta 11,600 en peces de agua dulce y salada (UNEP 2007). Adicionalmente, los valores experimentales validados arrojan factores de bioconcentración de 1000 a 3000 para peces (UNEP 2009). Los factores de bioacumulación (BAF) en 3 especies de peces del Ártico para “endosulfán suma” fueron de 1690 hasta 7280. En grasa de beluga y foca, este factor alcanza un promedio de  $3.95 \times 10^5$  (UNEP 2009). Se han reportado valores del coeficiente de partición octanol agua (Kow) entre 3 y 4.8 para los isómeros alfa, beta y sulfato de endosulfán (Lema 2011).

A diferencia de los plaguicidas organofosforados y carbonatos, las cualidades tóxicas de los organoclorados no son similares entre sí, aunque las

propiedades toxicológicas son analógicas a los organoclorados con estructuras similares, varía dependiendo de la sustitución de la molécula de cloro.

### **2.2.5. Impacto de los plaguicidas en el medio ambiente y la Zona Chinampera**

En la república mexicana 80% de la totalidad de uso de plaguicidas en el país, principalmente se confiere a los herbicidas, en segundo lugar, a los insecticidas y en tercer lugar a los fungicidas (Nonna 2006). Las principales regiones donde se concentran estos plaguicidas son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Puebla, Oaxaca y Estado de México (Marín 2009).

Los plaguicidas han sido aplicados en varios cultivos y particularmente en Xochimilco, situado en la Ciudad de México, en donde el método tradicional de cultivo es realizado en las “Chinampas”, caracterizadas por ser parcelas rectangulares o jardines flotantes, donde el suelo es utilizado para la producción de granos, productos hortícolas y flores (Chávez et al. 2011). Los estudios de sustentabilidad agrícola en las chinampas realizados por Carmona et al. (2014), indican que la actividad agrícola de Xochimilco se caracteriza principalmente por la integración de todos los recursos que utilizan agua con un riego selectivo, suelo con lodo y abono orgánico, cultivos con “almácigos” y “chapines”, microclima con los ahuejotes y espacio con siembras asociadas.

Considerando que las chinampas dan muestra de la complejidad de relaciones que trae implícita las prácticas agrícolas para aprovechar el agua, suelo, los residuos orgánicos y, con ello introducir policultivos de especies endémicas en un todo, para constituirse en una viabilidad de desarrollo local, por estas razones, este sistema chinampero es catalogado como ejemplo de biodiversidad endémica, agrícola y de Patrimonio Natural y Cultural de la Humanidad por la UNESCO en 1987. Sin embargo, corre el riesgo de desaparecer debido a varios factores, entre ellos su elemento central como es el agua, cuya calidad se ha ido deteriorando conforme el pasar de los años, aunque la planta del cerro de la estrella realice un tratamiento de las aguas

residuales, continua la contaminación en el agua por descargas domésticas y algunas actividades productivas como la ganadería traspatio, así como los residuos por el uso de fertilizantes (Carmona et al. 2014).

Desde 1991 se ha reportado que los agricultores en estos suelos han utilizado agua de los canales para regar en los cultivos de hortalizas, este recurso presenta varios elementos contaminantes dentro de los que se encuentran plaguicidas, fertilizantes y microorganismos patógenos. Dentro de los plaguicidas identificados se han encontrado los organofosforados, principalmente; metilparation, clorpirifos, malation y diazinon; organoclorados como el dicloro difenil tricloroetano (DDT) y otros plaguicidas como son el lindano y la atrazina. Adicionalmente, identificaron que parte de la composición del suelo contiene calcio, magnesio, sodio y potasio en diferentes proporciones formando los principales iones solubles responsables de la característica de la salinización del mismo. (Alcántara et al. 2013; Ramos et al. 2011).

Con respecto a los contaminantes biológicos, los microorganismos patógenos que afectan la inocuidad de los alimentos y la salud humana, se encuentra *E. coli*, que se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, generalmente se encuentra en los intestinos de los animales pero es un organismo ubicuo, capaz de adaptarse fácilmente a cualquier tipo de ambiente y por esta condición la transmisión de enfermedades en diferentes mecanismos y en la manipulación de alimentos es fácil y muy accesible hasta llegar al ser humano y desencadenar desde una diarrea leve a complicaciones de salud potencialmente fatales (Amézquita et al. 2016).

Se han determinado la presencia de bacterias de origen fecal, denominadas coliformes fecales, en el agua de los canales del embarcadero de Caltongo, con valores de entre 50 y 1100 NMP/100 mL fecales, los cultivos que se producen en Xochimilco incrementan en gran medida el riesgo de transmitir la enfermedad diarreica de origen bacteriano. El estudio realizado por Vega et al. (2005) en la determinación de bacterias de origen fecal en hortalizas cultivadas en Xochimilco, reportaron que los coliformes fecales superaron el valor

permitido de la norma NOM-093-SSA1-1994 (especificaciones sanitarias), afectando a los cultivos principalmente de epazote, espinaca y cilantro donde el autor concluye que el consumo crudo de estas hortalizas no es la única fuente de propagación de la diarrea de origen bacteriano, ya que también se ha demostrado que esta enfermedad puede propagarse a través del consumo del agua.

Las continuas descargas con agua contaminada y el uso extensivo e inapropiado de estos compuestos químicos ha generado un problema en la contaminación ambiental en la zona chinampera, ya que estos contaminantes presentan alta versatilidad en el suelo por difusión, escorrentía y lixiviación contaminando aguas superficiales y subterráneas; adicionalmente, la exposición continua en los suelos ha provocado diversos problemas en la salud de diferentes organismos como plantas, animales y poblaciones humanas puesto que estas sustancias de diferente naturaleza biológica y química pueden acumularse y biomagnificarse difundiendo a través de la cadena trófica (Ortiz et al. 2014).

Por las razones anteriormente mencionadas, se presenta la necesidad de desarrollar estrategias biotecnológicas para la recuperación y la conservación del agua como el elemento fundamental del funcionamiento de los ecosistemas que hacen parte de la zona chinampera, dentro de las diferentes técnicas más reportadas en la remediación de sitios contaminados se encuentran la incineración, excavación, adsorción, y biorremediación (Lin y Lin 2007; Li et al. 2010; Navaratna y Jegatheesan, 2010; Ortiz et al. 2014).

### **2.3. Tecnologías de biorremediación utilizando biosurfactantes**

Los Tensoactivos o surfactantes son moléculas anfipáticas que se acumulan en las interfaces, gas/líquido (aire-agua), líquido/líquido (aceite-agua) o líquido/sólido (agua/superficie de sólidos), provocando un descenso de la tensión superficial e interfacial del medio. A partir de determinadas concentraciones estas moléculas tienden a formar agregados tales como micelas, bicapas y vesículas (Van Hamme et al. 2006).

El término surfactantes naturales se refiere a aquellos compuestos de superficie activa de origen vegetal y animal, obtenidos por extracción, precipitación o destilación. Existen además los compuestos de superficie activa de origen microbiano, llamados también biosurfactantes y son obtenidos en procesos de fermentación. Los primeros están presentes en pequeñas cantidades en la naturaleza y el costo de su obtención excede el costo de la síntesis química, por lo que comúnmente se centra la atención en los tensoactivos producidos por microorganismos o biosurfactantes (Kłosowska et al. 2018).

La actividad superficial de un surfactante en general deriva de su estructura *anfifílica*, lo que significa que sus moléculas contienen porciones solubles e insolubles en agua. Esta característica reduce la tensión superficial de la solución al formar agregados o micelas con propiedades tales como emulsionar, formar espuma, dispersar, y la capacidad de actuar como detergente, lo que hace que los surfactantes sean compuestos químicos muy versátiles (Bustamante et al. 2012).

Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos producidos en superficies vivas como por ejemplo las superficies de células microbianas como bacterias, hongos, levaduras o también compuestos hidrofóbicos o hidrofílicos excretados al espacio extracelular. Estos compuestos tienen la capacidad de acumularse entre las fases fluidas reduciendo la tensión superficial utilizando los mismos mecanismos que los tensoactivos químicos, pero con varias ventajas: Biodegradabilidad, baja toxicidad, se pueden producir de materias primas muy baratas, no se ven afectados por factores ambientales como temperatura y pH, tienen biocompatibilidad y digestibilidad lo que permite su aplicación en cosmética, productos farmacéuticos y como aditivos funcionales para alimentos (Fakruddin 2012).

Los biosurfactantes son también más potentes y efectivos a una concentración crítica micelar a veces menor que la de los tensoactivos químicos, por lo que utilizar menos surfactante para lograr un máximo rendimiento es fundamental



en la práctica. Otra de las ventajas mencionadas es que estos compuestos se pueden utilizar para cambiar la hidrofobicidad de una superficie y de esta manera influir en la unión de los microorganismos sobre la superficie. Por ejemplo, un agente tensoactivo de *Streptococcus thermophilus* evita la colonización de otras cepas termófilas de *Streptococcus* sobre el acero que son las que lo contaminan (Santos et al. 2016).

El papel fisiológico principal de los biosurfactantes es permitir que los microorganismos crezcan en sustratos inmiscibles en agua al reducir la tensión superficial lo que hace que el sustrato esté más fácilmente disponible para la absorción y el metabolismo. Otras funciones descritas son: Actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos y adherencia celular para generar estabilidad en condiciones ambientales hostiles (Fakruddin 2012). Los biosurfactantes se clasifican principalmente según su estructura química y su origen microbiano. Las principales clases de biosurfactantes son glicolípidos como ramnolípidos, soforolípidos y trehalolípidos; ácidos grasos, fosfolípidos, lípidos neutros, biosurfactantes poliméricos y lipopéptidos como surfactina (Fakruddin 2012).

A continuación, en la Tabla 3 se observa los microorganismos con mayor estudio en la producción de biosurfactantes:

**Tabla 3.** Biosurfactantes derivados de microorganismos.

<b>Clase</b>	<b>Productos microbianos</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencias</b>
<b>Ramnolípidos</b>	<i>P. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	Emulsificación de hidrocarburos	Chrzanowsk et al. 2011; Chong y Li 2017

<b>Lípidos de trehalosa</b>	<i>R. erythropolis</i>	Remoción de metales del suelo y de microorganismos patógenos	Biniarz et al. 2016; Janek et al. 2018
	<i>A. paraffinicus</i>		
	<i>Corynebacterium spp.</i>		
	<i>Mycobacterium sp.</i>		
<b>Soforolípidos</b>	<i>Rothobacter sp.</i>	Mejorar la degradación y dispersión de diferentes clases de hidrocarburos.	Marchant y Banat 2012; Drakontis y Amins 2020
	<i>Mycobacterium sp.</i>		
<b>Glucolípidos</b>	<i>A. borkumensis</i>	Descontaminación de suelos	Abbasi et al. 2013; Mnif et al. 2017
	<i>Rodococcus sp.</i>		
	<i>Candida apícola</i>		
	<i>P. aeruginosa</i>		

### 2.3.1. Biosurfactantes de origen vegetal

Principalmente las saponinas son tensioactivos no iónicos derivados de plantas, que tienen una estructura molecular especial con una cadena principal de glicósido hidrófilo y un derivado de triterpeno lipófilo. Las saponinas, una clase de biosurfactantes no iónicos derivados de plantas, son compuestos glicosídicos presentes en muchas plantas comestibles y no comestibles de las plantas, como raíces, tallos, cortezas, hojas, semillas y frutos, y son surfactantes naturales no iónicos con un rendimiento excelente. Estos productos naturales se han utilizado tradicionalmente como detergente para el lavado y baño de telas (Kregiel et al. 2017). Los usos externos registrados de las saponinas como jabón de lavado han mencionado no presentar efectos tóxicos en la salud humana (Roy et al. 1997).

La saponina parecía ser un agente de limpieza atractivo para el lavado del suelo y tratamiento de agua, debido a su biodegradabilidad, baja toxicidad y fácil aislamiento de las plantas (Roy et al. 1997; Hong et al. 2002; Mulligan, 2009; Pacwa-Płociniczak et al. 2011). Algunos estudios investigaron la eliminación de metales pesados de los suelos contaminados por saponinas. Sin embargo, pocas investigaciones científicas han informado de una mayor solubilización de saponinas para compuestos orgánicos hidrofóbicos y hay poca información disponible sobre las propiedades de solubilización de las saponinas para esos contaminantes. (Hong et al. 2002; Mulligan 2009).

Además, podrían formar espuma estable como el jabón en soluciones acuosas. Las saponinas puras son blancas, no volátiles, y cristal acolumnado altamente higroscópico. Es soluble en solución acuosa alcalina y ácido acético glacial caliente, agua fría, etanol, éter de petróleo y otros solventes no polares. Las saponinas a menudo se dividen en saponinas triterpenoides y saponinas esteroides. Las saponinas triterpenoides se han extraído de muchas leguminosas y alliums, como la soja, los guisantes, los frijoles, la alfalfa, la espinaca, el té, la remolacha azucarera, el girasol, el ginseng, la quinoa, el regaliz y el castaño de Indias, etc. Las saponinas esteroides se encuentran en semillas de tomate, berenjena, pimientos de pimientos, avena, espárragos, alliums, fenogreco, yuca, ñame y ginseng.

A continuación, en la Tabla 4 se encuentran los biosurfactantes derivados de las plantas como son las saponinas.

**Tabla 4.** Tipo de biosurfactantes de origen vegetal según su clase, fuente y aplicación.

<b>Clase</b>	<b>Fuente</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencias</b>
Saponinas	Sapindus	Remoción de Ni, Cr y Mn de suelos	Maity et al. 2013
	Quillaja	Recuperación de Cr	Kilic et al. 2011
	Sigma	Mejorar la desorción de PCB y trazas de metales (Pb y Cu)	
	Sapindus	Remoción de Cu, Pb y Zn de suelos contaminados	Maity et al. 2013
	Sapindus chino	Mejorar el lavado de suelos contaminados con fenantreno	Song et al. 2008
	Quillaja	Desorción de Cu(II) y Ni(II) de caolita	Chen et al. 2008
	Té	Remoción de Cd, Pb y Cu	Liu et al. 2017

#### **2.4. Tecnologías de biorremediación utilizando extractos naturales de origen vegetal**

En los últimos años se ha evidenciado que dentro de las tecnologías de biorremediación ha crecido el interés por el estudio y la aplicación de los coagulantes naturales y la evaluación del efecto del extracto de semillas de las plantas, para el tratamiento de aguas residuales mediante la coagulación-floculación que reduce o neutraliza las cargas de los coloides (Kurniawan et al. 2020). Los coagulantes químicos como cloruro férrico y el sulfato de aluminio son los de mayor uso en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, estos compuestos de naturaleza química generan grandes volúmenes de lodos tóxicos difícilmente biodegradables, el uso de coagulantes con polímeros orgánicos sintéticos por ejemplo, la acrilamida ha generado efectos neurotóxicos y carcinogénicos (Aguilar et al. 2005).

Las ventajas que se han presentado al utilizar coagulantes naturales son principalmente por su eficacia en la reducción de la turbidez de aguas con altas concentraciones de sólidos suspendidos, adicionalmente, una característica fundamental es su alta estabilidad en el medio acuoso, estos coagulantes naturales se caracterizan por ser compuestos poliméricos, pueden ser catiónicos, aniónicos o no iónicos (Ramírez y Peralta, 2015; Solórzano 2010).

Los catiónicos y aniónicos se denominan polielectrolitos, varios estudios sobre coagulantes naturales, se refieren a ellos como polielectrolitos y en su mayoría son polisacáridos o proteínas, que no tienen necesariamente ausencia de interacciones de carga, puesto que puede haber interacciones entre el polímero y un disolvente en la solución (Solórzano 2010). Se han evaluado una amplia variedad de coagulantes naturales para la reducción de la turbidez del agua; dentro de los coagulantes reportados se encuentran los almidones utilizados en el estudio de Choy et al. (2016), donde evaluó el efecto coagulante del; arroz, trigo y papa, aumentando el porcentaje de disminución de la turbidez de agua sintética en un 30%. Por otra parte, se encuentran los estudios realizados para evaluar el efecto de los extractos de plantas caracterizándose por estar libre de tóxicos, reducir la producción de lodos 5 veces más que los químicos y presentar un alto valor nutrimental del mismo por lo que no necesitan ajuste de pH y no son corrosivos (Choy et al. 2014; Choy et al. 2016). Los estudios con extractos de plantas para el tratamiento de aguas residuales se han enfocado principalmente con el uso de las semillas, las plantas más estudiadas son *M. oleifera*, *Magnifera indica*, *Prunus armeniaca*, *Jatropha curcas*, *Hibiscus sabdarifa*, *Pleurotustuberregium*, *Azardiratica*, *Solanum melongena*, *Cynodon dactylon*, *Alternanthera sessilis*, *Anisochilus carnosuss*, *Musa paradisiaca* (Choy et al. 2014).

#### **2.4.1. *Moringa oleifera* y sus aplicaciones en el tratamiento de aguas**

La moringa pertenece a la familia Moringaceae, un grupo pequeño de plantas dentro del inmenso orden Brassicales que incluye la familia de la col y del rábano, conjuntamente con la familia del mastuerzo y de las alcaparras (APG

2009). *Moringa oleifera* (*M. oleifera*) es un árbol pequeño y de crecimiento acelerado que usualmente alcanza de 10 a 12 m de altura, es originario de Kerala, India. Dentro de *Moringa* hay 13 especies, las cuales abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento, desde hierbas y arbustos hasta árboles grandes (Verdcourt 1985; Olson y Razafimandimbison 2000).

Una característica muy importante de este árbol es su capacidad de resistencia a la sequía y el potencial agronómico ya que es un árbol cultivable en regiones áridas y semiáridas (Sánchez et al. 2013). La *M. oleifera* se utiliza con mayor frecuencia como alimento y como fuente medicinal en las comunidades menos desarrolladas, además, se ha informado que en las comunidades rurales de los países africanos se utilizan las semillas de *M. oleifera* para la disminución de la turbidez del agua (Sánchez et al. 2013).

Los múltiples estudios que se han realizado con *M. oleifera*, se deben principalmente a que es un recurso de proteína, calcio, hierro, carotenoides y compuestos fitoquímicos, las partes de las plantas se utilizan para aplicaciones en la industria farmacéutica, ambiental, médica, cosmética y suplementos alimenticios (Saini et al. 2016).

En las aplicaciones ambientales se ha utilizado como adsorbente, coagulante y desinfectante en la purificación y en el tratamiento de aguas residuales, por ejemplo, la acción coagulante ha sido justificada mediante mecanismos de neutralización de cargas superficiales, floculación por la generación de puentes de interpartículas y por consiguiente en el tamaño de las mismas provocando la precipitación de los coloides, la actividad antimicrobiana ha sido justificada por el compuesto químico 4 ( $\alpha$ -L-ramnosil-oxi)-bencil isotiocianato inhibiendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, el uso de la cáscara de la semilla se ha tratado como carbón activado para la remoción de metales pesados mediante mecanismos de biosorción (Nouhi et al. 2019). Algo importante que cabe resaltar en el tratamiento de la semilla es la extracción del aceite para que presente un mejor rendimiento en la formación de los flóculos, esto se debe a que el aceite, recubrimiento o película inhibe el contacto con la superficie del

contaminante principalmente para el tratamiento de compuestos hidrofóbicos como se evidenció en el estudio realizado por Infante et al. (2015) y Abolore et al. (2016).

## **2.5. Tecnologías de bioremediación de aguas residuales utilizando biofiltros y microorganismos**

La filtración no sólo ha sido considerada uno de los procesos de tratamiento más importantes en el manejo de aguas residuales sino uno de los más antiguos. El objetivo en general siempre ha sido obtener agua de excelente calidad que pueda reutilizarse para diferentes fines, incluso para el tratamiento del agua potable después de descubrirse la presencia de diferentes microorganismos en las tuberías detrás de muchos años de funcionamiento, esto debido a la presencia de materia orgánica biodegradable en dicha agua. (Mansouri et al. 2020). Adicionalmente, los subproductos de la desinfección del agua con cloro son cancerígenos y dañinos, por lo tanto, una alternativa biológica para el tratamiento del agua permite degradar esa materia orgánica, inhibir el crecimiento bacteriano y además mejorar su sabor y olor causando menor impacto en la salud de los seres vivos (Durgananda et al. 2003).

La filtración es un proceso físico destinado a clarificar un líquido que contenga sólidos en suspensión, haciéndolo pasar por un medio poroso, siguiendo procesos de coagulación (aglomeración), floculación (agitación y mezcla) y decantación (separación), permitiendo la eliminación de bacterias, color, turbiedad, e indirectamente, ciertos problemas de olor y sabor (Gómez 2006).

Cualquier tipo de filtro con biomasa adjunta en los medios filtrantes puede definirse, como un biofiltro y el principio básico de funcionamiento es el de biodegradar contaminantes según las características de los medios filtrantes (Durgananda et al. 2003).

Esta tecnología de biofiltración combina procesos de purificación físicos y biológicos utilizando medios filtrantes sumergidos en los que se asientan las bacterias que descomponen la contaminación. El material de filtro inerte puede ser mineral, plástico o sintético. El flujo de agua puede ser ascendente o

descendente; el primer caso se prefiere en las plantas industriales, debido a la facilidad de eliminar el exceso de biomasa por lavado a contracorriente (Rocher et al. 2012).

Los primeros biofiltros se desarrollaron utilizando roca o escoria como medio filtrante (Durgananda et al. 2003), y desde entonces se han estudiado gran cantidad de alternativas para diseñar biofiltros tales como; turba, diferentes tipos de carbón, hojas de té, desecho de coco, conchas de crustáceos, cáscara de plátano, cáscara de naranja, aserrín de caoba, escorias, vid, toronja, piñas de los árboles de pino, cáscara de limón, cáscara de trigo, cáscara de nuez, agujas de pino, hojas de bambú, raíces de pasto, astillas de madera hasta microorganismos que eliminan metales pesados como bacterias, hongos y diferentes tipos de algas (Gómez 2006).

Los biofiltros se utilizan actualmente para diferentes propósitos tales como tratamiento de aguas residuales primarias, terciarias o agua potable y dependiendo de lo anterior se utilizan diferentes parámetros y características para su diseño, elaboración, manejo y evaluación (Gómez 2006).

Aunque teóricamente todavía es difícil explicar el comportamiento de un biofiltro, en un sistema de biofiltración, los contaminantes se eliminan, debido a la degradación biológica en lugar del esfuerzo físico como ocurre en un filtro convencional. Esta degradación la realizan diferentes microorganismos como; bacterias aeróbicas, anaeróbicas y facultativas, hongos, algas y protozoos adaptadas a un medio filtrante (arena, grava, carbón activado, etc.) formando en la superficie una capa o biopelícula que requiere un aporte constante de sustancias orgánicas y nutrientes para mantenerse resistente (Durgananda et al. 2003).

El rendimiento de un biofiltro puede verse afectado según las características del medio del filtro, la tasa de carga hidráulica, la tasa de carga orgánica y las técnicas de lavado del filtro. Otros factores que se describen son la temperatura y la presencia de oxidantes como;  $O_3$ ,  $H_2O_2$ ,  $Cl_2$  y  $NH_4Cl$ , etc. Que deben estudiarse cuidadosamente antes de diseñar un sistema de biofiltración



(Durgananda et al. 2003). La calidad de un filtro depende de las características y propiedades de interacción de este con la sustancia o elemento a retener ya que se presentan diferentes procesos en su interior como intercambio iónico, conversión y descomposición biológica, absorción, adsorción, precipitación, oxidación y reducción química entre otros (Gómez 2006).

El funcionamiento económico y eficiente de un biofiltro depende en gran medida de las características de sus medios de soporte debido a que el rendimiento depende de la biomasa adherida (Ashraf et al. 2016). Por ejemplo, para el tratamiento de aguas residuales primarias la elección correcta de los medios filtrantes son la escoria fundida de horno alto, granito o medios sintéticos dependiendo del volumen de aguas residuales, mientras que para el tratamiento de aguas residuales terciarias se utilizan corrientes de aire que contienen compuestos orgánicos volátiles, y para el tratamiento de agua potable la mejor opción puede ser carbón granulado activado, antracita o filtro de arena. (Durgananda et al. 2003). Los medios utilizados en un biofiltro deberían proporcionar:

1. Una superficie adecuada para crecimiento rápido de la biomasa
2. Una mayor área superficial para crecimiento de biomasa
3. Buena textura superficial para contener biomasa contra cizalla y desprendimiento

## **2.6. Tecnologías de biofiltros utilizando como material filtrante el corcho en humedales para remoción de contaminantes**

Los humedales de tratamiento son sistemas diseñados muy parecidos a los humedales naturales que tienen bajos requerimientos de energía externa y se pueden construir para mejorar la calidad del agua por medio de una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos (Almuktar et al. 2018). Los procesos microbianos juegan un papel básico en la eliminación de diferentes contaminantes en los humedales de tratamiento, la capa de filtro utilizada en estos son un elemento clave para la eliminación de contaminantes en aguas residuales. Dependiendo de la vegetación y el tipo de flujo

convencional, los humedales de tratamiento pueden eliminar nitrógeno en el rango de 30 a 80% de los nitratos de los productos domésticos en aguas residuales (Almuktar et al. 2018; Zamora et al. 2019).

Adicionalmente, se han probado materiales reciclados como medios granulares para el tratamiento de agua residuales como virutas de neumáticos triturados reciclados con una eliminación del 56% para el nitrato-nitrógeno (García-Pérez et al. 2016) y otros como los residuos de corcho estudiados con más anterioridad, muestran una clara capacidad de adsorción relacionada con su composición química ya que contienen un polímero en sus paredes celulares llamado “*suberina*” considerado el componente principal responsable de su capacidad de adsorción de contaminantes orgánicos (Dominguez et al. 2007).

De los procesos de transformación de corcho, los granulados de corcho y el polvo de corcho, se obtienen como subproducto con diferentes granulometrías y densidades (Pintor et al. 2012). Este material tiene una alta porosidad y capacidad de adsorción, siendo un material con un gran potencial para ser aplicado en la purificación de agua/aguas residuales (Pintor et al. 2012).

Los sistemas de humedales se han utilizado hasta el momento principalmente para eliminar contaminantes comunes, como nutrientes, metales pesados y patógenos (Machado et al. 2016), también pueden ser efectivos para retener y eliminar contaminantes emergentes como los compuestos activos farmacéuticos como lo mencionan Verlicchi y Zambello (2014). La presencia de compuestos activos farmacéuticos en las fuentes de agua es una preocupación actual para la salud pública ya que se ha mencionado su presencia tanto en aguas residuales, aguas superficiales, sedimentos de ríos, aguas subterráneas y hasta en aguas potables (Machado et al. 2017).

Por último, otros estudios han demostrado la capacidad de modificar residuos de corcho y aumentar su efectividad en procesos de remoción de aguas residuales. La composición química del corcho depende de su origen y varía entre 40-60% de suberina, 10-50% de lignina, 5-15% de polisacáridos y 10-25% de componentes extraíbles que incluyen ceras y taninos (Chubar et al.

2003; Olivella et al. 2013). Las moléculas de lignina y suberina poseen grandes números de restos fenólicos que pueden ser oxidados enzimáticamente y de esta manera Francesko et al. (2015) en su trabajo mencionan que las matrices de corcho biocatalíticamente funcionalizadas con nanopartículas redujeron eficientemente el crecimiento de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* durante el transcurso de 5 días y sugieren la aplicación potencial de matrices de corcho funcionalizadas en humedales de tratamiento como un adsorbente para la eliminación de impurezas de aguas residuales al mismo tiempo que evita la contaminación microbiana.

### **2.7. Tecnologías de biofiltros utilizando como material filtrante el corcho en humedales para remoción de contaminantes**

Los principales estudios sobre biodegradación de plaguicidas organoclorados implementan cultivos microbianos aislados a partir del suelo afectado, dentro de las que se destacan diferentes bacterias como *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Sphingobacterium sp.*, *Streptomyces sp.*, *Micrococcus sp.* y diferentes hongos como *Trichoderma viridae*, *Pleurotus ostreatus*, *Penicillium miczynskii*, *Aspergillus sydowii*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium raistrickii*, *Aspergillus sydowii* (Meleiro et al. 2011).

De acuerdo con la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, la biodegradación es "La Descomposición de una sustancia catalizada por enzimas in vitro o in vivo" (Karigar y Rao 2011). La biodegradación de estos compuestos es a menudo compleja e implica una serie de reacciones bioquímicas. Aunque muchas enzimas catalizan eficientemente la biodegradación de los plaguicidas, la plena comprensión de la vía de biodegradación a menudo requiere nuevas investigaciones. Diversos estudios sobre biodegradación de plaguicidas han demostrado solo el total de plaguicidas degradados, pero no se han investigado en profundidad los nuevos productos biotransformados y su destino en el medio ambiente (Karigar y Rao 2011; Gurung et al. 2013).

La cepa bacteriana de genero *Pseudomonas* sp. Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo aeróbico que existe en el suelo, pero también en el agua dulce y salada. Este género consume todo tipo de sustratos orgánicos como los azúcares y aminoácidos, alcoholes, hidrocarburos, ácidos húmicos e inclusive algunos plaguicidas sintéticos (Wilderer et al. 1998). Las cepas de *Pseudomonas* son agentes activos de la mineralización de materia orgánica y también son responsables de la descomposición de la comida. El género incluye especies patógenas para el hombre, animales domésticos y cultivos (Palleroni 1981).

La morfología básica de *Pseudomonas* sp. Son comunmente bacilos rectos o ligeramente curvos en un plano, presentan flagelos polares y ausencia de esporas. La mayor parte de las especies de *Pseudomonas* tienen una gran versatilidad nutricional, por lo que son capaces de degradar una gran cantidad de compuestos orgánicos simples y complejos (Palleroni 1981). Por tal razón, se convierte en un microorganismo muy implementado en diferentes estudios de degradación de compuestos xenobióticos.

## **2.8. Técnicas moleculares convencionales y para determinar la viabilidad celular**

La técnica de la PCR, las siglas en inglés de “*Polymerase Chain Reaction*” es una técnica de amplificación molecular de ácidos nucleicos que se fundamenta en la característica intrínseca de las ADN-polimerasas para replicar hebras de ADN a partir de un molde (Costa 2004; Garibyan y Avashia 2013). Se caracteriza por ser un método muy rápido, versátil, preciso, sensible y que permite detectar y cuantificar de forma específica un microorganismo de interés en todo tipo de muestras, aunque estas no sean estériles (Costa 2004; Garibyan y Avashia 2013).

Inicialmente, se parte de una muestra mínima de ADN a partir de la cual se quiere obtener gran cantidad de copias. Para ello, durante el proceso de amplificación se alternan ciclos de altas temperaturas (95 °C) en los cuales se separan las hebras del ADN presente en la muestra, seguidos de ciclos a

temperaturas bajas (55-65 °C) para que vuelvan a unirse y puedan ser duplicadas nuevamente. En el momento en el que las hebras se encuentran separadas, las polimerasas se unen a ellas y mediante el uso de cebadores generan nuevas cadenas de material genético utilizando estas como molde (Costa 2004; Garibyan y Avashia 2013).

Estos **cebadores** permiten la **amplificación selectiva** de determinadas secuencias de ADN de modo que facilitan el uso de esta técnica para la detección de fragmentos concretos de genoma en una muestra. En caso de desear la detección de un microorganismo determinado en una muestra problema se utilizan cebadores que flanqueen una secuencia génica específica de este, de modo que solo habrá amplificación si esta secuencia se encuentra entre el ADN problema. En la PCR convencional son necesarias un mínimo de 100-1000 copias de ADN en la muestra inicial para poder observar amplificación.

Las desventajas de acuerdo con lo descrito por Costa (2014), indica que la técnica de PCR presenta las siguientes limitaciones:

- **Especificidad vs. rendimiento:** cuando más especificidad se quiere conseguir en la amplificación del ADN, más disminuye el rendimiento del proceso. Es necesario encontrar un punto medio.
- **Efecto inhibitorio** que pueden tener sobre la amplificación algunas sustancias naturales presentes en la muestra.
- **Sobreestimación** de los resultados.
- **Incapacidad** del método de distinguir si el material genético amplificado pertenece a células vivas o muertas.
- **Saturación de la reacción:** cuando se agotan los *primers* o los nucleótidos, se detiene la reacción. Debe tenerse en cuenta y controlarlo.
- **Fácil contaminación.**
- **Resultados a tiempo final.** Además, la tinción con EtBr no proporciona un resultado cuantitativo.

### **2.8.1. Técnica molecular qPCR a tiempo real**

La principal ventaja que presenta la qPCR en comparación con la PCR convencional es que permite la monitorización a tiempo real de la cantidad de cadenas de ADN que se están produciendo, al final de cada ciclo, sin tener la necesidad de interrumpir el proceso ni de esperar a su finalización (Foulds et al. 2002). Esto es gracias a la incorporación en la *mix* de sistemas de fluorescencia. La PCR a tiempo real (qPCR) como la PCR convencional nos permiten detectar cualquier molécula de ADN que pueda estar presente en una muestra (Foulds et al. 2002). Sin embargo, no es suficiente ya que la presencia de ácidos nucleicos no está relacionada necesariamente con la presencia del microorganismo activo, pueden ser simplemente restos. En determinados casos, es necesario determinar si en una muestra hay un microorganismo en concreto vivo (Roca 2014).

Por este motivo, se ha desarrollado un nuevo sistema de detección molecular llamado PCR de viabilidad (vqPCR) que mediante la utilización de agentes intercalantes del ADN nos permite diferenciar entre células vivas y muertas ya que solo permite la amplificación del material genético no modificado, que en este caso es el de las células vivas (Roca 2014).

### **2.8.2. VqPCR**

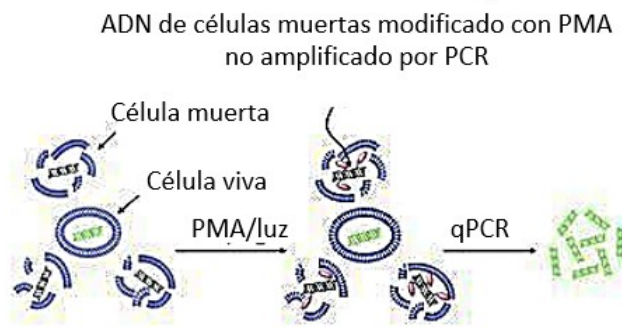
La PCR de viabilidad es una tecnología innovadora que permite la diferenciación entre microorganismos vivos y muertos, basados en la pérdida de integridad de la membrana celular en células muertas. El sistema de PCR de viabilidad utiliza el agente de intercalación de DNA (PMA) monoazida de propidio. El PMA es una molécula química que se aplica en una gama de aplicaciones de biología molecular en constante crecimiento para diferenciación de microorganismos vivos y muertos a nivel de ADN. Después de la fotoactivación con una longitud de onda definida, el PMA se intercala y se une covalentemente al ADN. La posterior amplificación del ADN modificado se inhibe, resultando en una reducción en la señal de amplificación (Joo y Park 2019).

El PMA no puede pasar a través de membranas biológicas intactas. Esto significa que el ADN de los microorganismos vivos, que tienen membranas intactas, está protegido de modificaciones de PMA y, por lo tanto, es detectable por PCR. Membranas de los microorganismos muertos pierden su funcionalidad protectora y la PMA puede ingresar estas células y modificar su ADN. El ADN modificado de los microorganismos muertos es inhibido de la detección por PCR, lo que resulta en una señal de amplificación reducida (García-Cayuela et al. 2019).

El PMA lleva una fuerte carga positiva que garantiza que no pueda pasar membranas celulares vivas intactas. También tiene un grupo de anclaje que se une irreversiblemente al ADN tras la activación con luz de una longitud de onda definida. (Nocker et al. 2007).

La PCR a tiempo real (qPCR) como la PCR convencional nos permite detectar cualquier molécula de ADN que pueda estar presente en una muestra, sin embargo, la presencia de ácidos nucleicos no está relacionada necesariamente con la presencia del microorganismo en sí, activo, pueden ser simplemente restos. En determinados casos, es necesario determinar si en una muestra hay un microorganismo en concreto vivo. Por este motivo, se ha desarrollado un nuevo sistema de detección molecular llamado PCR de viabilidad (vqPCR) que mediante la utilización de agentes intercalantes del ADN nos permite diferenciar entre células vivas y muertas ya que solo permite la amplificación del material genético no modificado, que en este caso es el de las células vivas. (Nogva et al. 2003; Rudi et al. 2005; Nocker et al. 2007).

A continuación, en la figura 1, se observa el mecanismo del PMA o *propidium monoazide* como molécula intercalante en células bacterianas.



**Figura 1.** Esquema representativo del funcionamiento del PMA

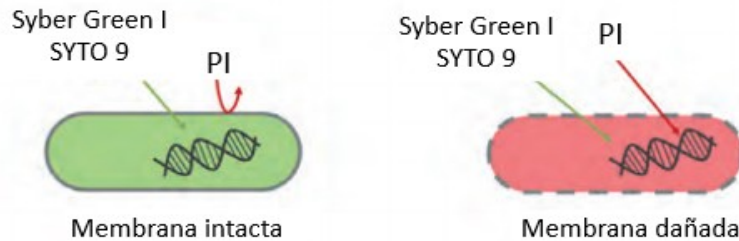
### 2.8.3. Técnica live/dead INVITROGEN

Los kits de viabilidad proporcionan un nuevo ensayo de fluorescencia de dos colores de viabilidad bacteriana que ha demostrado ser útil para una amplia gama de géneros bacterianos (Robertson et al. 2019). La viabilidad se basa en características metabólicas o de membrana y su integridad. Sin embargo, los métodos que dependen de las características metabólicas a menudo solo funcionan para un subconjunto limitado de grupos bacterianos. Los métodos para evaluar la integridad de la membrana bacteriana comúnmente tienen altos niveles de fluorescencia de fondo. Ambos tipos son muy sensibles al crecimiento y condiciones de tinción debido a las marcadas diferencias en morfología, citología y fisiología de las bacterias. Un ensayo de viabilidad realiza un recuento directo de aplicación universal tiene a sido muy difícil de lograr. Nuestro LIVE / DEAD (Stiefel et al. 2015).

Según los estudios realizados por Stiefel et al. (2015), indica que los kits de viabilidad bacteriana de LIVE/DEAD utilizan mezclas tinción de ácido nucleico fluorescente verde SYTO® 9 y la tinción de ácido nucleico fluorescente roja, yoduro de propidio. Estas manchas difieren tanto en sus características espectrales como en su capacidad para penetrar en células bacterianas sanas. Cuando se utiliza solo, la mancha SYTO 9 generalmente etiqueta todas las bacterias en una población, aquellos con membranas intactas y aquellos con



membranas dañadas, Por el contrario, el yoduro de propidio penetra sólo bacterias con membranas dañadas, causando una reducción en la fluorescencia de la tinción de SYTO 9 cuando ambos tintes están presentes. Así, con una mezcla adecuada de SYTO 9 y tinciones de yoduro de propidio, bacterias con membranas celulares intactas. Como se observa en la Figura 2.



**Figura 2.** Patrones de fluorescencia de células sanas, muertas y lesionadas teñidas con yoduro de propidio y SYTO 9 (kit LIVE/DEAD).

#### 2.8.4. Técnica de citometría de flujo

La citometría de flujo tiene la capacidad de medir las características ópticas y de fluorescencia de una sola célula o cualquier otra partícula tal como microorganismos, núcleos y preparaciones cromosómicas en una corriente fluida cuando pasan a través de una fuente de luz (Macey 2010). El tamaño, granularidad y características fluorescentes de las células, derivadas de cualquiera, los anticuerpos o tintes, son también ejemplos de parámetros utilizados para analizar y diferenciar las células (Wilkerson 2012). El principio subyacente de la citometría de flujo está relacionado con la luz, dispersión y emisión de fluorescencia, que se produce en forma de luz de la fuente de excitación (comúnmente un rayo láser) que golpea las partículas en movimiento. La dispersión de la luz es directamente relacionada con las propiedades estructurales y morfológicas de la célula mientras donde la emisión de fluorescencia derivada de la sonda de fluorescencia es proporcional a la cantidad de sonda fluorescente unida a la célula o componente celular (Macey 2010).

Los clasificadores de células (FACS) son citómetros de flujo que tienen la capacidad para clasificar células marcadas con fluorescencia de una población celular mixta (Wilkerson 2012). Los principales componentes de los citómetros de flujo y los clasificadores celulares. Son básicamente fluidos, ópticos (excitación y colección), una red electrónica (detectores) y un ordenador.

La citometría de flujo se utiliza en diversas aplicaciones basadas en la detección de la membrana, Adicionalmente, células enteras y componentes celulares, tales como orgánulos, núcleos, ADN, ARN, cromosomas, las citoquinas, las hormonas y el contenido de proteínas (Wilkerson 2012).

## **2.9. Aplicación Biotecnológica: Sistema de filtración con hidroponía para purificación de agua**

### **2.9.1. Tratamiento de aguas residuales para riego agrícola**

La aplicación de aguas residuales municipales tratadas para el riego agrícola presentan un gran potencial (Meda y Cornel 2010), especialmente cuando se integra con la reutilización de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Norton-Brandao et al. 2013). Sin embargo, la reutilización agrícola de las aguas residuales municipales depende en gran medida de composición química de las aguas residuales, que determina los métodos y grado de tratamiento requerido. Además, las principales preocupaciones relacionadas con la reutilización de aguas residuales municipales son, su impacto en la salud humana y riesgo ambiental debido a la presencia de patógenos. En consecuencia, los efluentes de las aguas residuales deben someterse a un tratamiento secundario. Antes del uso para riego y esto ayudará a reducir el riesgo de patógenos asociado con su reutilización (Oyama et al. 2008).

Los estudios asociados con el uso agrícola de las aguas residuales para la producción de plantas demostraron que las aguas residuales tratadas son una buena fuente de nutrientes y riego (Lubello et al. 2004; Almukhtar et al. 2015; Bonvin et al. 2015). El uso de aguas residuales municipales tratadas

terciariamente como fuente de riego ha demostrado no tener limitaciones importantes para una planta cultivada en viveros, ya que el contenido de nutrientes fue capaz de mantener el crecimiento de las plantas (Lubello et al. 2004). Del mismo modo, Rusan et al. (2007), reportaron aumentos en el crecimiento de plantas de cereales regados con aguas residuales municipales tratadas bajo condiciones de campo. Otros autores, sin embargo, han argumentado que los efluentes de aguas residuales no pueden usarse como la única fuente de nutrientes para las plantas y sugieren que se necesitan suplementos de fertilizantes para sostener el crecimiento de las plantas (Fonseca et al. 2007; Almuktar et al. 2015).

Las plantas cuando se riegan con aguas residuales municipales tratadas dependen de las propiedades fisicoquímicas del medio de crecimiento, así como la calidad de las aguas residuales utilizadas (Barton et al. 2005). Esto se debe a que la capacidad de retención de nutrientes, la materia orgánica y la actividad biológica del suelo que afectan la absorción y disponibilidad de nutrientes (Acosta-Martínez et al. 2007). Los estudios realizados en campos agrícolas regados con aguas residuales municipales demostraron un mayor reciclaje de nutrientes y suelo con actividad biológica (Chen et al. 2008), y esto se atribuye a la contribución posterior de material orgánico y nutrientes fácilmente degradables derivado de aguas residuales tratadas (Friedel et al. 2000). Además de la composición química de los efluentes, el tipo de sistema de tratamiento de aguas residuales utilizado desempeña un papel importante de uso agrícola. Esto es porque diferentes aguas residuales producen efluentes que tienen diferentes propiedades. Por ejemplo, se informa que una planta convencional de tratamiento de aguas residuales (CWT) tiene una alta eficiencia de eliminación de la demanda biológica de oxígeno (DBO) y alta eficiencia de eliminación de nutrientes como nitrógeno y fósforo en comparación con las plantas de tratamiento de lagunas (Muga y Mihelcic, 2008).

Esto se debe a que el sistema convencional de tratamiento de aguas residuales consiste en una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos. Con la eliminación de sólidos, materia orgánica y nutriente en aguas residuales y, por

tanto, con alta eficiencia de eliminación de DBO, nitrógeno total y fósforo. Por otro lado, la mayor limitación de los efluentes de aguas residuales de las plantas de tratamiento de lagunas se asocia con la alta nivel de sólidos en suspensión y DBO que están asociados con una alta concentración de algas (Kaya et al. 2007). Sin embargo, la presencia de algas en el sistema de tratamiento de aguas residuales de la laguna es una demostración de la capacidad fotosintética que, en la misma esencia, destaca la idoneidad de sistemas de crecimiento de plantas para el tratamiento de aguas residuales. Por lo tanto, la incorporación del tratamiento de aguas residuales con el sistema de producción de cultivos especialmente la hidroponía puede reducir el riesgo de contaminación ambiental porque los nutrientes y el dióxido de carbono liberados en las plantas de tratamiento de aguas residuales, puede usarse para la producción de biomasa vegetal, aumentando así el oxígeno a través de la fotosíntesis.

### **2.9.2. Sistema de tratamiento de hidroponía**

La reutilización de aguas residuales municipales en la agricultura a través de sistemas hidropónicos puede ser una oportunidad viable para evitar el impacto al medio ambiente y el en la salud pública. Estos sistemas se han utilizado ampliamente para la producción de diversos tipos de verduras y frutas en sistema hidropónico, las plantas se desarrollan con las raíces sumergidas en una solución nutritiva o mantenidas a través de sustrato inerte dentro de tanques provistos de soluciones formuladas de nutrientes. Por lo tanto, el uso de tales sistemas promueve el uso de ambientes naturales para el tratamiento de aguas residuales municipales y es una práctica común en el manejo de aguas residuales, especialmente en los pueblos pequeños o comunidades (Bawiec et al. 2016).

En una planta de tratamiento hidropónico de aguas residuales, las plantas de cultivo crecen utilizando nutrientes ricos aguas residuales y esto forma parte del paso del tratamiento biológico se considera un paso esencial del tratamiento. La planta, es la responsable de la mayor parte de la eliminación de nutrientes, especialmente nitrógeno (Norström et al. 2003). Varios estudios

piloto han indicado que el tratamiento hidropónico de aguas residuales tiene algunas ventajas en comparación con los métodos convencionales (Osem et al. 2006; Carvalho et al. 2018; Gebeyehu et al. 2018) Similar a los humedales construidos, los mecanismos de eliminación de contaminantes de las aguas residuales municipales en el sistema hidropónico implican combinación de procesos físicos, biológicos y químicos con microorganismos, plantas e interacciones basadas en medio. A continuación, se presentan las ventajas del uso de un sistema hidropónico de acuerdo a lo descrito por Stottmeister et al. (2003) y Vinita et al. (2008).

### **Ventajas en el uso de sistemas hidropónicos**

- Sistemas económicos y tecnologías amigables ambientalmente
- Utilizan plantas con importancia comercial para la eliminación de contaminantes en aguas residuales.
- Requiere menos área y se puede implementar en el sitio.
- Resultados positivos para el tratamiento de aguas residuales.
- Eliminación de Nitrógeno total, amoniacal y nitrógeno nitrato entre 47 y 91% para nitrógeno y fosforo con diferentes especies de plantas
- Reducción de microorganismos patógenos

Se ha estudiado también el enfoque basado en el análisis de costos y beneficios entre la tecnología hidropónica para el tratamiento de aguas residuales y el tratamiento convencional de aguas residuales, medido en: trabajo requerido, recursos usados, bienes producidos o valor de consumo. Aunque estos estudios informaron diferencias significativas entre los dos sistemas, el tratamiento hidropónico de aguas residuales requirió más inversión inicial de capital, mano de obra y costo de energía (Schrammel 2014). Sin embargo, el costo beneficio varía según la ubicación, el clima y la conciencia de la sociedad con respecto a los impactos de las aguas residuales en la contaminación ambiental.

### **2.9.3. Capacidad del sistema en la eliminación de contaminantes**

La técnica de eliminación de nutrientes depende de las interacciones vitales de varias especies de bacterias, raíces de plantas, grava, agua y luz solar. Todos estos ayudan a contribuir tanto directa como indirectamente en la eliminación de contaminantes de aguas residuales municipales. El sistema de raíces de las plantas modifica las condiciones de vida de los microorganismos presentes en las aguas residuales municipales mediante la liberación de varios metabolitos y, por lo tanto, mejora la actividad biológica. El tratamiento de aguas residuales a través de procesos de nitrificación y desnitrificación (Tsao 2003). Además de la eliminación de nutrientes, la integración de las aguas residuales municipales y el sistema hidropónico pueden ayudar en la producción biomasa para cultivos de valor agregado, mejorando así la seguridad alimentaria y generación de ingresos entre comunidades pobres (Mavrogianopoulos et al. 2002; Snow y Ghaly 2008).

Este sistema es particularmente adecuado para la reutilización agrícola de aguas residuales municipales porque minimiza el riesgo de salud para los trabajadores, los cultivos cosechados y el consumidor que ocurren a través del contacto con aguas residuales (Qadir et al. 2010). Se ha informado que los patógenos asociados con la reutilización de aguas residuales se reducen en los casos en que los cultivos comestibles se cultivan utilizando un sistema hidropónico. La ventaja de este sistema para minimizar la contaminación por patógenos se atribuye al hecho de que permite diferentes formas de técnica como el cultivo del agua, técnica de riego por goteo (DIT).

#### **2.9.4. Clasificación de sistemas hidropónicos para el tratamiento de aguas residuales**

En general, la clasificación del sistema hidropónico adecuado para el tratamiento de aguas residuales municipales en términos de eliminación de nutrientes y contaminantes depende de tres factores principales: el destino del drenaje de la solución nutritiva (sistemas abiertos o cerrados); cómo se entrega la solución nutritiva (selección de sustrato) y el tipo de biofiltros utilizados para la eliminación de nutrientes (selección de cultivos) (Sambo et al. 2019).

En términos de drenaje, se utilizan sistemas abiertos (drenaje libre) y cerrados (recirculación) para la producción de cultivos hidropónicos. Sin embargo, para fines de tratamiento de aguas residuales, los sistemas cerrados son los preferidos comúnmente por su capacidad para eliminar la descarga de contaminantes al medio ambiente. Esta característica, en particular, es una de la razón principal por la cual un sistema hidropónico es reconocido como uno de la tecnología eficiente y sostenible para la reutilización de aguas residuales en la agricultura (Sambo et al. 2019).

En sistemas hidropónicos cerrados, la misma solución nutritiva se recircula y las concentraciones de nutrientes son monitoreadas y ajustadas de acuerdo con las necesidades de la planta. Mientras en los sistemas hidropónicos abiertos, se aplica una solución nutritiva fresca para cada ciclo de riego. El agua de drenaje del sistema hidropónico abierto generalmente contiene una cantidad significativa de nutrientes que se liberan en el medio ambiente, lo que resulta en graves problemas de contaminación. Estudios de investigación indicó que la recirculación del agua de drenaje puede mantener significativamente la sostenibilidad de las aguas residuales hidropónicas de bajo costo y ayudar a reducir la huella ambiental causada por la industria del tratamiento de aguas residuales y agrícolas (Van Os 1999; Grewal et al. 2011).

La eficiencia de un sistema hidropónico cerrado para el uso de nutrientes es atribuible a su capacidad para usar una menor concentración de nutrientes. Aunque los sistemas cerrados demuestran una alta eficiencia en el uso de agua y nutrientes, requieren un manejo constante en términos de pH, conductividad eléctrica y patógenos. En términos de concentración de nutrientes, concentraciones específicas de iones debe determinarse para mantener un medio nutriente adecuado ya que la absorción de iones no es constante en el tiempo ni entre especies iónicas (p. ej., diferencial absorción de fosfato y nitrato) (Grewal et al. 2011).

#### **2.9.5. Selección de sustrato**

Según el tipo de sustrato (medio de crecimiento) utilizado en un sistema hidropónico para tratar aguas residuales, Haddad et al. (2012) especifica que los sistemas hidropónicos se dividen en dos tipos principales, (a) cultivo en solución, como la técnica de película de nutrientes (NFT), subrrigación pasiva, sistema de mecha y sistemas de goteo continuo y, (b) sistemas llenos de medios tales como sistemas de crecimiento de plantas hidropónicas, sistemas de crecimiento de plantas aeropónicas, inundación y sistemas de drenaje, sistema de cultivo estático y sistemas de cultivo en aguas profundas. Riego por goteo subterráneo para todos los sustratos y fuentes de agua utilizadas, en comparación con el riego por goteo superficial.

Se informaron diferencias significativas cuando el refluo y la inundación sistema hidropónico en rendimiento de fruta de tomate de racimo único usando rayón: Se prefirió el poliéster 70:30 sobre el acolchado de papel negro como medio de crecimiento. Estos resultados sugieren que el rendimiento del sistema hidropónico de aguas residuales en términos de suministro de nutrientes para el crecimiento de las plantas varía. Dependiendo del tipo de medio de crecimiento y sistema de riego utilizado. Por lo tanto, la prioridad debe centrarse en la selección del sustrato para evitar futuros inconvenientes relacionados con el funcionamiento normal de las aguas residuales (Haddad y Mizyed 2011).

#### **2.9.6. Selección de cultivos**

Las especies de cultivos juegan un papel importante en el alcance del sistema hidropónico que trata las aguas residuales municipales, no sólo mediante la captación directa de nutrientes o promoviendo la actividad microbiana sino también asegurando la aceptación e implementación de este tipo de tecnología en zonas urbanas respecto al tipo de plantas utilizadas. Sin embargo, debido a la singularidad de este sistema, no hay metodología disponible para seleccionar plantas que sean adecuadas para el sistema hidropónico de aguas residuales. La mayoría de los estudios que involucran el uso agrícola de aguas residuales utilizadas en cultivos ornamentales o especies vegetales (Oyama et al. 2008; Krishnasamy et al. 2012; Prazeres et al. 2016).



Las verduras como los tomates, el pepino y la lechuga y las flores cortadas son comúnmente utilizadas para la producción hidropónica, debido a su corto crecimiento ciclo que permite un mejor control y estandarización del proceso de cultivo. Atributos de calidad de cultivo como sabor, color, aspectos nutricionales y firmeza, vida útil, atributos de procesamiento y resistencia a los patógenos, son algunos de los criterios utilizados para la selección de cultivos (Brummell y Harpster 2001). Se han informado muchos beneficios con respecto al uso de aguas residuales tratadas en sistemas hidropónicos para producir vegetales, Sin embargo, se ha observado una reducción en la calidad del cultivo y la vida útil lo que puede limitar el uso de estos sistemas (Brummell y Harpster 2001).

#### **2.9.7. Efectividad de la hidroponía para el tratamiento de aguas residuales y sistema de crecimiento vegetal**

En los sistemas hidropónicos convencionales, las plantas se cultivan sin tierra, en medios que usan una solución nutritiva compuesta de agua y fertilizantes solamente. Las plantas generalmente se cultivan en un medio inerte, principalmente hecho de un material como grava o lana de roca para soporte estructural (Elkazzaz y Elkazzaz 2017). Del mismo modo, las aguas residuales municipales tratadas o parcialmente tratadas pueden ser aplicadas directamente a las raíces de la planta en lugar de usar una solución de nutrientes para cumplir con los requisitos de nutrientes de la planta en sistemas de cultivos hidropónicos (Haddad y Mizyed 2011).

La hidroponía puede apoyar el crecimiento de casi cualquier especie vegetal y se pueden usar varios tipos de macetas, desde contenedores, canales, tuberías, etc. El sistema ha demostrado tener varias ventajas sobre producción de cultivos de campo de tal manera que se informa que la tasa de crecimiento de la planta es 30–50% más rápido que una planta de suelo, cultivada en las mismas condiciones. Además, en los sistemas de tratamiento y reutilización de aguas residuales hidropónicas, se elimina el requisito de tierra para la producción de cultivos y el riesgo de contaminación del suelo por acumulación de sales y sólidos debido a la reutilización de efluentes. Sin embargo, hay

algunas restricciones relacionadas con el elevado costo y en ciertas ocasiones la tecnología puede ser bastante exigente para sistemas de pequeña escala (Haddad et al. 2006).

Además, los microorganismos juegan un papel importante en los nutrientes y eliminación mediante su transformación y conversión en su propia biomasa. Se han realizado varios estudios de investigación para determinar la capacidad de absorción de las plantas en el sistema hidropónico. Por ejemplo, Vaillant et al. (2003) realizó un estudio sobre las capacidades de eliminación de nitrógeno y fósforo del sistema hidropónico NFT para el tratamiento de aguas residuales domésticas. Los autores informaron una reducción del 93% de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  determinándose que la nitrificación es el proceso más dominante (Vaillant et al. 2003).

#### **2.9.8. Eliminación de contaminantes orgánicos y patógenos**

El uso del sistema hidropónico fue efectivo para agotar la DQO, la DBO y TSS con reducciones de 82, 91 y 98%, respectivamente. Estos resultados sugieren que el uso de un sistema hidropónico como tratamiento de aguas residuales puede ofrecer soluciones sostenibles para el medio ambiente y la protección ecológica (Prazeres et al. 2017).

Los microorganismos patógenos se encuentran entre los principales desafíos que afectan la adopción de la reutilización agrícola de las aguas residuales debido a su impacto en salud humana. Por ejemplo, las bacterias, los virus y los protozoos son de particular interés para el uso agrícola de las aguas residuales municipales debido a su naturaleza compleja y su impacto nocivo en la salud humana. Se informa que estos patógenos son responsables de muchas enfermedades infecciosas tanto en países en desarrollo como desarrollados (Almuktar y Scholz 2016). El principal indicador bacteriano de la contaminación fecal útil en los estudios de reutilización de la calidad de las aguas residuales es *E. coli*, considerada con efectos nocivos para la salud. Siempre que se exponga a niveles mensurables, el tiempo de supervivencia en el agua podría alcanzar hasta 60 días (Pereira et al. 2014). Se ha informado

que los sistemas hidropónicos mejoran la eficiencia de eliminación de patógenos en el sistema de tratamiento de aguas residuales.

El proceso de eliminación implica una serie de mecanismos, como la filtración, que es proporcionada por arena debajo del lecho de grava donde se filtran y eliminan los microorganismos y a través de la antibiosis, un proceso donde los microorganismos interactúan con entre sí biológicamente resultando en la reducción de su población (Martin et al. 2013). La capacidad del sistema hidropónico para la eliminación de patógenos en aguas residuales domésticas para el crecimiento de *Bidens pilosa L* y *Amaranthus hybridus L*. informando una eficacia de eliminación del 92,77% para la eliminación de coliformes fecales. Además, la capacidad del sistema de tratamiento de aguas residuales hidropónicas para la eliminación de microorganismos fue examinada por Ottoson et al. (2005) su estudio incluyó el análisis de muestras no tratadas, en parte aguas residuales tratadas y tratadas para indicadores microbianos fecales (Coliformes, *E. coli*, esporas de *Clostridium perfringens* y colifagos somáticos).

El sistema de tratamiento ha sido ampliamente estudiado por su eficiencia de eliminación microbiana que va desde 60 a 87% con aguas residuales tratadas que informan la mayor eficiencia de eliminación debido al alto tiempo de retención, filtración de arena y sedimentación. Se informa que la absorción y adsorción de la planta al sistema radicular ha contribuido a la eliminación microbiana en el sistema (Ottoson et al. 2005). Como resultado, estos autores destacaron que tales riesgos deben tenerse en cuenta si las plantas regadas con aguas residuales se van a utilizar para el consumo humano. Esto incluye medidas como el pretratamiento de las aguas residuales para la eliminación de patógenos antes de que puedan usarse en un sistema hidropónico, selección de cultivos que puedan ser cocidos antes del consumo, y el uso de un sistema de riego que minimiza el contacto entre las aguas residuales y la cosecha (Ottoson et al. 2005).

El uso del sistema hidropónico para el tratamiento de aguas residuales presenta amplios beneficios y es más sostenible en comparación con otros sistemas convencionales de tratamiento biológico de aguas residuales. La

alternativa de la aplicación biotecnológica tiene como propósito la implementación de un sistema terciario que remueva microorganismos patógenos y contaminantes mejorando la calidad de las aguas residuales para riego. Por tal razón, en el siguiente estudio se evaluará el efecto de un sistema hidropónico NFT con un sistema de filtración de grava y corcho funcionalizado con un extracto que presenta actividad antimicrobiana derivado de las semillas de *M. oleifera* para la inhibición de *E. coli*. Así mismo, determinar si la calidad del agua residual que abastece el sistema para el buen funcionamiento de los cultivos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El agua es el elemento fundamental para el correcto funcionamiento de los ecosistemas y de la zona chinampera como el recurso hídrico esencial para el riego de los cultivos y el único sustento económico para la mayoría de los chinamperos. Así mismo, las chinampas dan muestra de la complejidad de relaciones que trae implícita las prácticas agrícolas para aprovechar el agua, suelo, los residuos orgánicos y con ello introducir policultivos de especies endémicas en un todo, para constituirse en una viabilidad de desarrollo local, por estas razones, este sistema chinampero es catalogado como ejemplo de biodiversidad endémica, agrícola y del Patrimonio Natural y Cultural de la Humanidad por la UNESCO en 1987. Sin embargo, el agua de los canales se encuentra contaminada con microorganismos patógenos, disruptores endócrinos (entre ellos los plaguicidas organoclorados), metales pesados y con alta salinidad, debido a las actividades agrícolas tradicionales entre otros aspectos. Por ello se requiere el desarrollo y aplicación de tecnologías sustentables de biorremediación adecuadas para el sitio, para descontaminar, conservar y usar el recurso hídrico en las actividades agrícolas.

Entre las tecnologías de biorremediación se encuentran la evaluación del efecto del extracto de las semillas de *M. oleifera* en diferentes áreas de aplicación ambiental siendo ampliamente estudiada, principalmente porque afectan algunos parámetros fisicoquímicos y biológicos sustentando la eficacia del tratamiento de aguas residuales, remoción de contaminantes recalcitrantes y metales mediante mecanismos de adsorción, agente coagulante, agente acondicionador de lodos y agente desinfectante. Sin embargo, no ha sido muy elucidado aquellos estudios para evaluar su efecto como biosurfactante derivado de la semilla de la planta, esta acción ayudaría a disminuir la tensión superficial del agua e incrementar la solubilidad del contaminante (compuestos grasos, hidrocarburos, metales y plaguicidas) para que pueda ser más accesible a procesos de biodegradabilidad. (Yañez *et al.*, 2011). Adicionalmente, se han reportado estudios donde compuestos fitoquímicos provenientes de las semillas presentan propiedades antimicrobianas reduciendo en alta concentración celular bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella* sp y

*Staphylococcus* sp. Por tal razón, en el siguiente estudio se evaluará el efecto de las propiedades tensoactivas y emulsificantes del extracto de las semillas de *M. oleifera* (MoSe) sobre la remoción de un plaguicida organoclorado (Endosulfán) y la inhibición de un microorganismo indicador de contaminación fecal (*E. coli*). Así mismo, se determinarán el efecto de los compuestos fitoquímicos en su acción antimicrobiana, específicamente de microorganismos patógenos de un agua residual pretratada de un apantle de Xochimilco.

#### 4. HIPÓTESIS

La semilla de *M. oleifera*, remueve plaguicidas y microorganismos patógenos a través de sus propiedades tensoactivas y emulsificantes, lo cual permitirá mejorar la calidad del agua residual pretratada de un apantle de Xochimilco.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Determinar las propiedades tensoactivas y emulsificantes de las semillas de *M. oleifera* en la remoción de plaguicidas y microorganismos patógenos y evaluar la calidad del agua residual pretratada de un apantle de Xochimilco.

### 5.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la actividad tensoactiva y emulsificante de *MoSe*, tamaño de partícula, tiempo de contacto, concentración micelar crítica, índice de emulsificación, salinidad y pH seleccionados según las condiciones de la Zona Chinampera.
- Identificar los componentes de *MoSe* que presentan características tensoactivas y emulsificantes y se correlacionan con la inhibición de *E. coli*.
- Evaluar el efecto *MoSe* en la remoción de plaguicidas y la inhibición de microorganismos patógenos mediante respirometría eléctrica y la concentración mínima inhibitoria.
- Evaluar el efecto de *MoSe* funcionalizada en grava y corcho sobre la inhibición y el porcentaje de viabilidad de *E. coli* utilizando la técnica de fluorescencia y VqPCR.
- Desarrollar una aplicación biotecnológica con *MoSe* en un agua residual pretratada y evaluar la calidad del agua.



## 6. METODOLOGÍA

A continuación, en la Figura 3, se presenta el esquema general de la metodología propuesta para la determinación de las propiedades tensoactivas y emulsificantes de las semillas de *M. oleifera* en la remoción de plaguicidas y microorganismos patógenos y la evaluación de la calidad del agua residual pretratada de un apantle de Xochimilco.

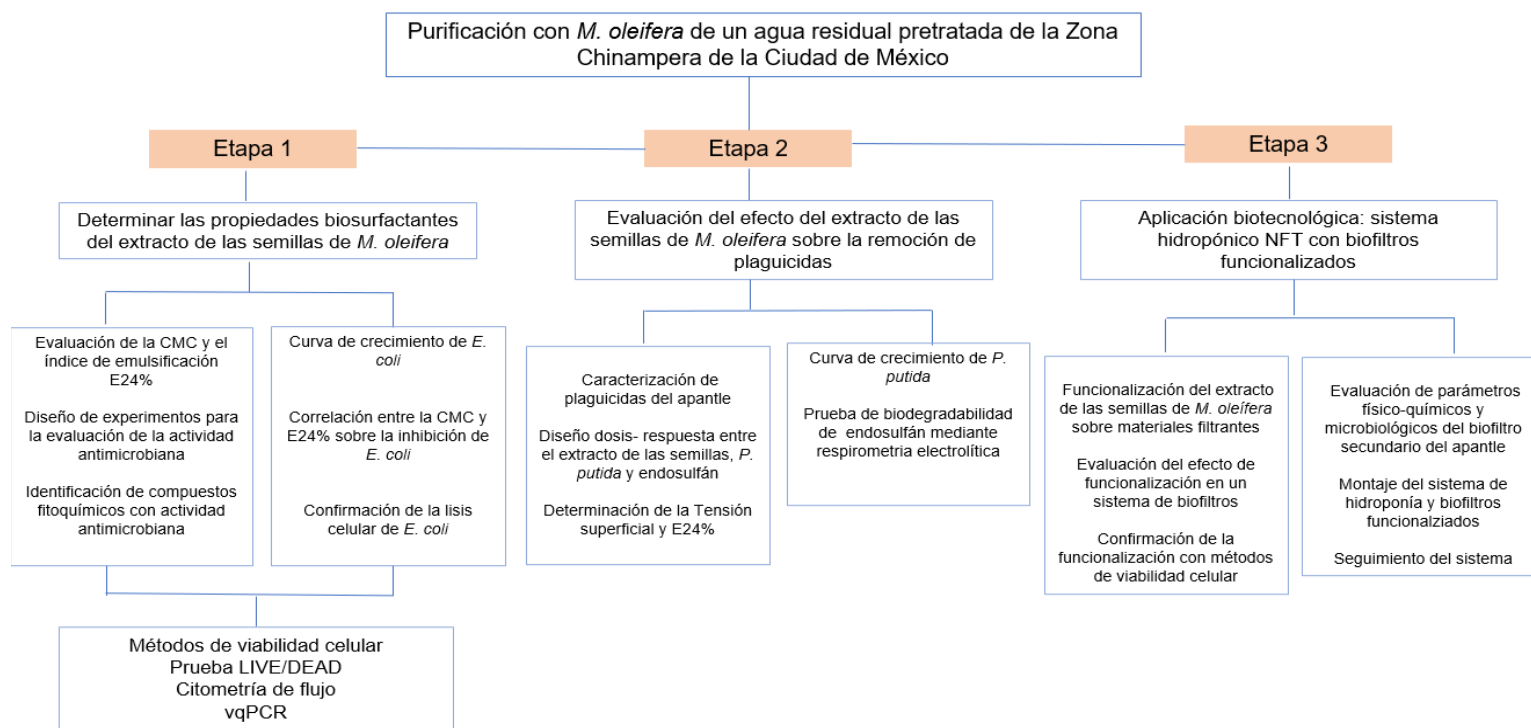


Figura 3. Esquema general de la metodología experimental.

**Metodología para evaluar el efecto de la actividad tensoactiva y emulsificante del extracto de la semilla de *M. oleifera*, tamaño de partícula, tiempo de contacto, concentración micelar crítica, índice de emulsificación, salinidad y pH seleccionados según las condiciones de la Zona Chinampera.**

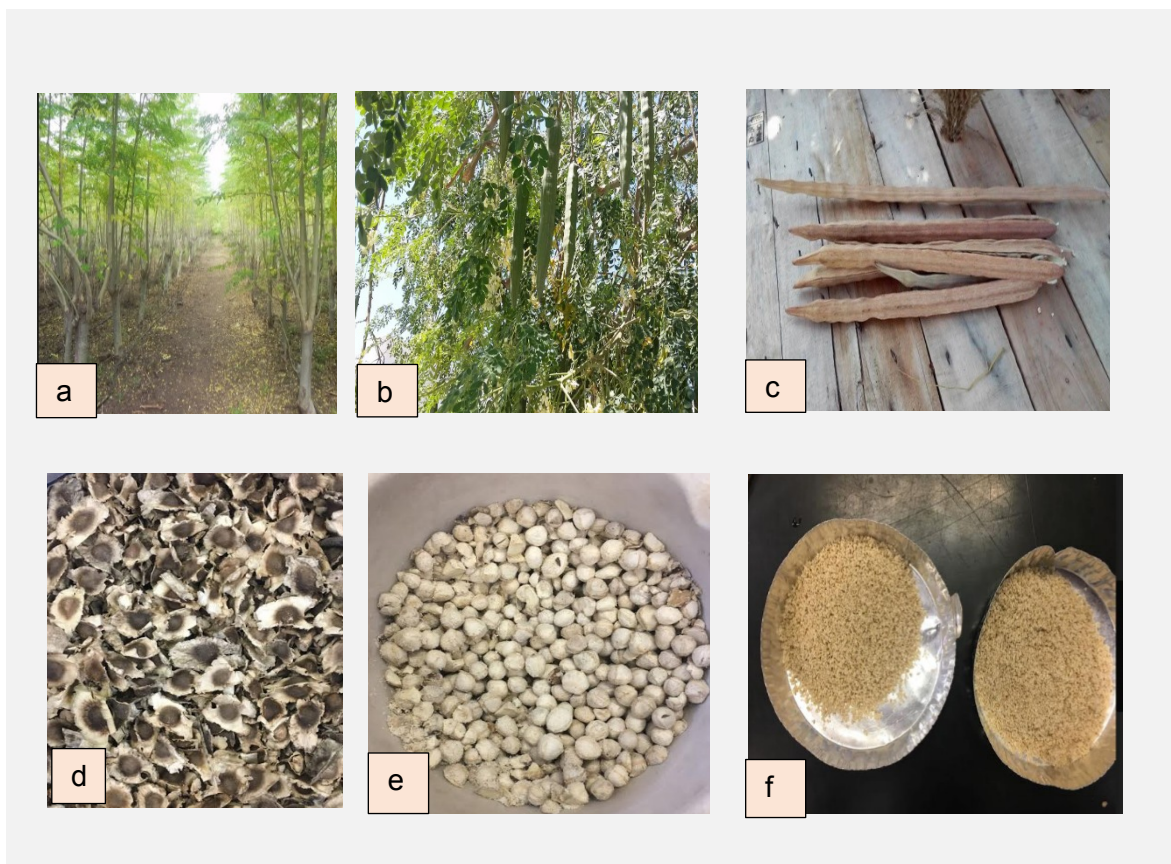
## **6.1. Evaluación del efecto de la actividad tensoactiva y emulsificante del extracto de la semilla de *M. oleifera***

### **6.1.1. Recolección de las semillas y preparación de los extractos de *M. oleifera***

Las semillas de *M. oleifera* fueron proporcionadas con el apoyo del Dr. Ramón Ignacio Castillo López de la Universidad Autónoma de Sinaloa, la recolección se realizó en el campo experimental San Miguel Arcángel, ubicado en la población de las Higueras de Jesús María en el Municipio de Culiacán, Sinaloa con coordenadas de Longitud  $-107^{\circ}28'15''$  y latitud de  $25^{\circ}5'23''$  a 200 metros sobre el nivel del mar.

Inicialmente, se retiró la cascara con un mortero para obtener las semillas (granos de color blanco crema) posteriormente se trituraron con un molino doméstico y fueron utilizados dos tamaños de tamices para generar las partículas de la semilla de Moringa de 2 y 0.86 mm, respectivamente. Estas partículas se recogieron por separado y se introdujeron en un desecador durante 24 horas. Posteriormente, se prepararon dos soluciones stock para cada tamaño de partícula a una concentración de 5000 mg/L, esto se realizó pesando en una balanza analítica 5 gramos de partículas de semillas y agregándolas a 1 litro de agua destilada, las dos soluciones se agitaron inmediatamente por 5 minutos utilizando un mezclador magnético. A estas soluciones se les denominó extractos de semillas de Moringa (Villaseca 2014).

A continuación, en la Figura 4, se muestran las plantaciones provenientes de la semilla de Moringa, características de la planta y preparación de la semilla para la obtención de los extractos.



**Figura 4.** Selección de *M. oleifera* y semillas tamizadas para la preparación de los extractos. Plantaciones de Moringa del campo experimental San Miguel Arcángel (a); hojas pinnadas y frutos (b); fruto seco como capsula leñosa y seca(c); semillas con un diámetro de 1.5-3 cm de diámetro con un centro de color café oscuro y 3 alas de color beige (d); semillas sin cascara de color blanco crema (e); semillas tamizadas (f).

#### **6.1.2. Evaluación de la concentración micelar crítica (CMC) para seleccionar la mejor dosis según la actividad emulsificante de *M. oleifera***

La efectividad de un agente emulsificante se puede establecer en base a diferentes parámetros, todos ellos relacionados con su capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos y disminuir la tensión superficial y/o interfacial, uno de

ellos es la Concentración Micelar Crítica o CMC y la disminución de la tensión superficial (Anton 2005; Raiger y López 2009).

Para determinar la CMC se prepararon diferentes concentraciones de *MoSe* (100, 300, 700, 1000 y 1500 mg/L) y se midió la tensión superficial con el método tradicional del anillo “Du-Nouy” con el uso de un tensiómetro, el procedimiento es descrito a continuación:

- Se Limpia el anillo con acetona y se pone a la llama hasta el rojo vivo
- Calibrar el tensiómetro
- Colocar 15 mL de la solución acuosa en el recipiente especial del tensiómetro
- Sumergir el anillo en la solución acuosa
- Subir el anillo, hasta que el anillo se desprenda de la solución acuosa
- Medir en ese momento el valor de la tensión superficial en mN/m
- Después de un periodo de tiempo se logró un valor estable que se puede considerar como el equilibrio

### **6.1.3. Capacidad emulsificante de los extractos de *Moringa oleifera***

La medida de la estabilidad de una emulsión se debe a la capacidad que tiene un agente de superficie de incrementar el tiempo entre la formación de su emulsión y su rotura (Costa et al. 2019).

La estabilidad de la emulsión generada por *MoSe* se analizó por medio del  $E_{24\%}$  realizado de acuerdo a la metodología descrita por Santos et al. (2017) descrita a continuación:

- Agregar 2 mL de *MoSe* 2 mL de diésel en un tubo de ensayo
- Agitar a alta velocidad durante 2 min en vórtex y se dejar reposar durante 24 h.

- El índice de emulsificación se determinó como el porcentaje de la altura de la capa emulsionada (mm) dividido por la altura total de la columna de líquido (mm).

## 6.2. Diseño de experimentos

Con la finalidad de evaluar el efecto de *MoSe* sobre la reducción de microorganismos patógenos y plaguicidas, se realizó un diseño factorial fraccionado  $2^{6-3}$  con 6 variables independientes (tiempo de lisis, tamaño de partícula, tiempo de contacto, concentración micelar crítica CMC, salinidad y pH), las variables dependientes fueron 6 (proteínas totales, azúcares reductores, capacidad emulsificante, oxígeno disuelto, conductividad y recuento celular en placa) para un total de 8 tratamientos (Montgomery 2012). Las CMC fueron seleccionadas por la mayor estabilidad del índice de emulsificación y la disminución de la tensión superficial del extracto de las semillas de *M. oleifera*, las soluciones simulaban las condiciones del agua de los canales de la Zona Chinampera como se observa en la Tabla 5.

Factores		Nivel	
		Bajo	Alto
Tiempo de lisis (horas)	X1	2	3
Tamaño de partícula (mm)	X2	0.86	2
CMC (mg/L)	X3	700	1500
Tiempo de contacto (min)	X4	20	60
Conductividad ( $\mu\text{s/cm}$ )	X5	1700	4000
pH	X6	7	8.5

**Tabla 5.** Diseño factorial fraccionado  $2^{6-3}$  para la reducción de microorganismos patógenos y remoción de plaguicidas.

### 6.2.1. Diseño de Experimentos para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la semilla de *M. oleifera* y preparación de las soluciones

Para la consecución de los experimentos en cuanto a la evaluación de la reducción de *E. coli*, previamente se aplicaron los tratamientos a partir de un diseño factorial fraccionado ya establecido  $2^{6-3}$  (ver Sección 6.2). A continuación, en la Tabla 6 se encuentran las interacciones entre los niveles y factores independientes.

**Tabla 6.** Interacciones del diseño factorial fraccionado  $2^{6-3}$  entre los niveles de los factores independientes con un total de 8 tratamientos y 24 experimentos por triplicado.

Tratamiento	Tiempo de Lisis (h)	T partícula (mm)	CMC (mg/L)	Tiempo contacto (min)	Conductividad ( $\mu\text{s/cm}$ )	pH
1	2 (-1)	0.8 (-1)	700 (-1)	60 (1)	4000 (1)	8.5 (1)
2	3 (1)	0.8 (-1)	700 (-1)	20 (-1)	1700 (-1)	8.5 (1)
3	2 (-1)	2 (1)	700 (-1)	20 (-1)	4000 (1)	7 (-1)
4	3 (1)	2 (1)	700 (-1)	60 (1)	1700 (-1)	7 (-1)
5	2 (-1)	0.8 (-1)	1500 (1)	60 (1)	1700 (-1)	7 (-1)
6	3 (1)	0.8 (-1)	1500 (1)	20 (-1)	4000 (1)	7 (-1)
7	2 (-1)	2 (1)	1500 (1)	20 (-1)	1700 (-1)	8.5 (1)
8	3 (1)	2 (1)	1500 (1)	60 (1)	4000 (1)	8.5 (1)

Números sin codificar: Nivel alto (1) y Nivel bajo (-1).

Adicionalmente para evaluar el efecto del extracto de las semillas de *M. oleifera* en la reducción de *E. coli* se realizaron los tratamientos con una solución control (hipoclorito de sodio y *E. coli*) y blanco (solución salina y *E. coli*) con un volumen

final de trabajo de 300 mL, la composición de las soluciones se encuentra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Soluciones para evaluar el efecto del extracto de las semillas de *M. oleífera* en la reducción de *E. coli*.

<b>Solución con el extracto de <i>M. oleífera</i> (mL)</b>	<b>Solución control (mL)</b>	<b>Solución blanco (mL)</b>
Agua destilada estéril	Agua destilada estéril	
Extracto de moringa	Detergente Cloro	Agua destilada estéril
Suspensión bacteriana	Suspensión bacteriana	
Cloruro de sodio	Cloruro de sodio	Suspensión bacteriana
Vf: 300	Vf: 300	Vf: 300

Para la preparación de las soluciones en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los tratamientos se utilizaron dos CMC de 700 y 1500 mg/L a partir de *MoSe* teniendo en cuenta el tamaño de partícula de 0.86 y 2 mm, se ajustó el pH y la conductividad por medio de un equipo multiparamétrico Hanna HI9828, de esta manera se simuló así algunas condiciones fisicoquímicas de los cuerpos hídricos de las chinampas. Para ajustar el pH se prepararon soluciones de HCl y NaOH 1M y para la conductividad se preparó una solución de NaCl 1 M.

## **6.2.2. Factores dependientes del diseño de experimentos**

### **6.2.2.1. Cuantificación de proteínas totales**

Para confirmar la lisis celular de la membrana se cuantificó las proteínas totales con el método de Bradford (1976). Que se basa en la unión del colorante Azul Coomassie a la proteína produciendo una coloración azul, la cual se lee a una longitud de onda de 595 nm.

#### **6.2.2.2. Cuantificación de azúcares totales**

La cantidad de azúcares totales se determinó mediante el método colorimétrico de acuerdo a la metodología de DuBois et al. (1956). En el cual, se agregaron 2 mL de muestra con 2 mL de fenol al 5% en tubos de vidrio, estos se colocaron en baño de agua fría. Posteriormente, se añadieron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se dejaron reposar por 15 min y la absorbancia fue leída a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro UV-VIS 1800 Shimadzu. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **6.2.2.3. Medición de parámetros fisicoquímicos**

A partir de las muestras recolectadas se midió el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto con el equipo multiparamétrico Hanna HI9828, únicamente de la hora inicial y de la hora final, con el fin de observar y analizar la variación de estas condiciones fisicoquímicas a través del tiempo de contacto de cada una de las soluciones con *MoSe*.

#### **6.2.2.4. Tensión superficial**

La tensión superficial se determinó mediante el método de anillo usando un tensiómetro de fuerza de acuerdo a la metodología de (Anton 2005). Las unidades se reportarán en mN/m y las mediciones se realizaron por triplicado (véase sección 5.2.)

#### **6.2.2.5. Actividad emulsificante**



Para estimar la capacidad emulsificante se agregarán 2mL de diesel como fase dispersa a 2 mL de muestra, se agitará a alta velocidad durante 2 minutos. La lectura se realizará a las 24 horas. El índice de emulsificación (E<sub>24</sub>%) se calculará dividiendo la altura de la capa de emulsión sobre la altura total, por 100 (Cooper 1987 y Pruthi 1996) (véase sección 2.2.1.).

### 6.2.3. Análisis Estadístico

Las variables de respuesta evaluadas fueron Tensión superficial (mN/m), E<sub>24</sub> (%), Inhibición de *E. coli* (%), oxígeno disuelto (mg/L), conductividad eléctrica (µs/cm), proteínas totales, azúcares totales y pH. La temperatura promedio de las soluciones durante las pruebas fue entre 15 y 20 °C. El análisis de varianza (ANOVA) fue la técnica estadística que se empleó para contrastar la hipótesis. El valor de alfa se determinó para una confiabilidad del 95% (Alfa = 0.05). La hipótesis nula siempre postuló la igualdad entre los tratamientos del diseño factorial fraccionado 2<sup>6-3</sup>, mientras que la hipótesis alternativa siempre postuló que al menos uno de los tratamientos produce un efecto diferente. La regla de decisión fue que no existen diferencias significativas entre los tratamientos cuando en el ANOVA el valor de  $p \geq 0.05$  y, por el contrario presentan diferencias significativas cuando el valor de  $p < 0.05$ .

Adicionalmente, se empleó el análisis de regresión mínima generalizada y la prueba de comparación de medias de LSD diferencia mínima significativa después de haber utilizado la prueba de t de Student para la comparación de dos medias con varianza ponderada cuando en los ANOVAs presentaron diferencias significativas. El análisis de medias de LSD permitió determinar cuál o cuáles tratamientos son los que presentan diferencias significativas, clasificándolos en diferentes grupos dependiendo la similitud que presentan las medias entre sí.

Para el ANOVA y las pruebas de LSD se empleó el programa SAS (The SAS System versión 9.1, SAS Institute, 2002), en la siguiente tabla se puede observar un ejemplo del análisis de varianza y la prueba de LSD, Tabla 8.

**Tabla 8.** Interpretación del análisis estadístico.

Tratamiento	Valor de $p$ (Anova)	Interpretación	Prueba de LSD	Resultados de LSD	Análisis de LSD
1	$p > 0.05$	No hay diferencia entre los tratamientos	No se realiza, todos los tratamientos son iguales	---	---
2				---	---
3				---	---
1	$p < 0.05$	Si hay diferencia entre los tratamientos	Si se realiza, por lo menos uno de los tratamientos es diferente	A	No hay diferencia significativa entre el tratamiento 1 y 2 Hay diferencia con el tratamiento 1 y 2
2				A	
3				B	

### 6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *M. oleifera* sobre *E. coli*

A continuación, se realizó el ensayo de la actividad antimicrobiana con el propósito de evaluar el efecto de *MoSe* sobre el porcentaje de inhibición de microorganismos patógenos como *E. coli*.

El procedimiento se realizó de la siguiente forma:

- Inicialmente se preparó una solución con un volumen de 30 mL de agua destilada estéril (10% del volumen final)
- Se utilizó un repique bacteriano de 12 a 18 horas de incubación.
- Posteriormente se agregó a la solución la cantidad de colonias suficientes para alcanzar una absorbancia de  $0.28 \pm 0.01$  a una longitud de onda de 475 nm, esta medición se realizó utilizando un equipo espectrofotométrico. El valor de absorbancia expresa una concentración inicial de  $1.5-3.0 \times 10^8$  UFC/mL.
- Se colocaron las soluciones en un tiempo de contacto con los extractos sin la suspensión bacteriana en un shaker o agitador a condiciones de temperatura ambiente y a 120 rpm, estos tiempos estaban dados en intervalos de 20 y 60 minutos respectivamente.
- Se añadió la suspensión bacteriana y se colocaron nuevamente en el shaker a temperatura de 37 °C y a 120 rpm, tomando muestras de aproximadamente 5 mL a las 0, 2 y 3 horas del inicio del experimento.
- A partir de las muestras tomadas en cada tiempo se realizarán diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , cada una de las diluciones se sembró por duplicado en cajas de Petri con agar nutritivo.
- Las cajas petri se dividieron en la cantidad de diluciones preparadas y se colocaron tres gotas de cada dilución en la fracción de la caja correspondiente con la ayuda de una micropipeta hasta un volumen entre 8-10  $\mu$ L por gota.

- Las cajas se pusieron en una superficie plana antes de ser llevadas a incubación para permitir que el agar absorba la gota y no se mezclen. La incubación se realizaba por 12 horas a una temperatura de 37 °C (Miles y Misra, 1938).
- Posteriormente, se realizaron los recuentos para cada tiempo (0, 2 y 3 horas) contando las colonias dentro de cada gota, el informe de células registradas fue de UFC/mL.
- Los resultados de la actividad antimicrobiana fueron expresados en % de reducción de organismos usando la siguiente fórmula: la diferencia entre las UFC/mL del tiempo "0" y las UFC/mL al terminar el tiempo 2 y 3 (Standard Test Method 2008).

#### **6.3.1. Cinética de crecimiento de *E. coli***

- Se realizó una curva de crecimiento de *E. coli* durante 8 horas en medio nutritivo líquido a 37 °C con 120 rpm, adicionalmente, se midió la absorbancia y la concentración celular con un recuento en placa utilizando la técnica de microgota descrita a continuación:
- A partir de las muestras tomadas en cada tiempo se realizarán diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , cada una de las diluciones se sembró por duplicado en cajas de petri con agar nutritivo.
- Las cajas petri se dividieron en la cantidad de diluciones preparadas y se colocaron tres gotas de cada dilución en la fracción de la caja correspondiente con una micropipeta hasta un volumen entre 8-10  $\mu$ L por gota.

- Las cajas se pusieron en una superficie plana antes de ser llevadas a incubación para permitir que el agar absorba la gota y no se mezclen. La incubación se realizó por 12 h a una temperatura de 37 °C (Miles y Misra, 1938).
- Posteriormente, se realizaron los recuentos para cada hora contando las colonias dentro de cada gota, el informe de células registradas fue de UFC/mL.

### **6.3.2. Identificación molecular de una cepa presuntiva de *E. coli* recolectada de los canales de agua de la Zona Chinampera**

A partir de las muestras de agua recolectadas de los canales de Xochimilco, se cultivó la cepa bacteriana en el medio selectivo de Eosina azul de metileno EMB para bacilos Gram negativos entéricos y en agar nutritivo a 37°C durante 24 horas respectivamente, la cepa aislada se identificó en el laboratorio de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV en la Ciudad de México.

A partir de aproximadamente 500 mg de biomasa de cada aislamiento se procedió a la extracción de ADN, por medio del kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep. La cantidad de ADN obtenido se midió a partir del espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek).

Del ADN total obtenido, se amplificó el gen 16s ARNr con los oligonucleótidos 27F y 1492R de acuerdo a las condiciones previamente descritas por Lane (1991). Se utilizó un gel de agarosa al 1% para comprobar el tamaño del fragmento esperado (1500 nt) por una hora a 100V. La secuenciación del gen 16s ARNr fue realizada por el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV con el cual se obtuvieron dos secuencias por cada oligonucleótido.

Las secuencias fueron editadas manualmente por medio del programa Chromas 2.4 (2012) conformando una secuencia consenso, por cada aislamiento. Las secuencias consenso de cada una de las muestras se comparó con el programa

nucleotide BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para encontrar similitudes entre secuencias biológicas. Las secuencias consenso se alinearon junto con las resultantes de la búsqueda BLAST, con el programa Clustal W incluido dentro del programa MEGA 6.0 para realizar un dendograma total con el método de NeighborJoining y observar las similitudes entre secuencias de especies tipos definidas, que resultaron relacionadas en el programa de BLAST (Tamura et al. 2013).

### 6.3.3. Confirmación de la lisis celular de *E. coli*

- Se confirmó la lisis y muerte celular mediante la PCR de viabilidad y Microscopía de fuerza atómica o microscopía de fluorescencia siguiendo las metodologías propuestas por (Cawthorn et al. 2008).

### 6.3.4. Ensayo de desinfección con *Moringa* y determinación de la viabilidad celular mediante vqPCR

Se dividió en 3 fases:

Primera Fase:

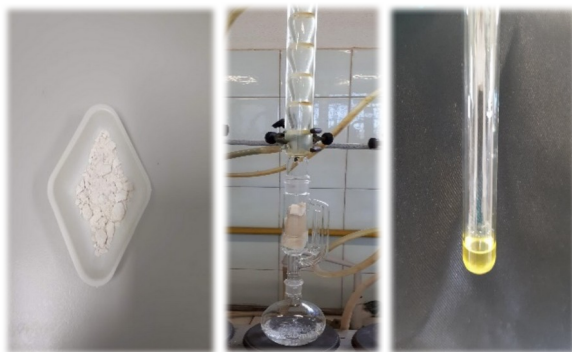
- **Obtención de las semillas y preparación del extracto de *M. oleifera***

Las semillas y las hojas de *M. oleifera* fueron proporcionadas con el apoyo por la Dra Beatriz Amante y el Dr. Víctor López del laboratorio ambiental de ingeniería textil de la Universidad Politécnica de Cataluña, el material fue recolectado en las Islas Canarias, España (Figura 5).



**Figura 5.** Hojas y semillas de *M. oleífera*.

Las semillas fueron retiradas de la cáscara y posteriormente, trituradas y tamizadas para obtener un tamaño de partícula de 0.86 mm, adicionalmente, para realizar las pruebas de la CMI, las semillas fueron sometidas a pruebas soxhlet para retirar el aceite utilizando 2 tipos de disolventes hexano y etanol. Se pesaron 3 gramos de semillas para obtener 1 mL de aceite de semillas de *M. oleífera* como se observa a continuación en la Figura 6.



**Figura 6.** Proceso de extracción de aceite de la semilla

#### **Método de extracción de aceite de las semillas de *M. oleífera***

Se realizó el proceso del análisis del aceite de las semillas de *M. oleífera*, la extracción se realizó mediante el método gravimétrico 1664 de la revisión A para grasas y aceites por la EPA (2009) con modificación de microsoxhlet.

- Inicialmente, los matraces de extracción se introdujeron en la estufa a 105 °C, se enfrían en un desecador y se pesan. Consecutivamente, se colocó un papel filtro de tamaño de 40  $\mu m$  en el embudo Büchner, se ubicó el embudo en un matraz

Kitazato y se agregaron 50 mL de la suspensión tierra de diatomeas-sílice sobre el filtro, se aplicó vacío y se lavó con 100 mL de agua.

- Adicionalmente se transfirió el total de la muestra acidificada al embudo Büchner al vacío. Se midió el volumen de la muestra (en este caso 200 mL), adicionalmente con pinzas, se transfirió el material filtrante a un cartucho de extracción, donde se limpian las paredes internas del embudo y el frasco contenedor de la muestra, con trozos de papel filtro previamente impregnado con hexano y etanol (disolventes).
- A continuación, el cartucho se secó en una estufa con una temperatura de 105 °C por 30 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h. Se adicionó el volumen de 100 mL al matraz de extracción y preparar el equipo Soxhlet.
- Se mantuvo el equipo sobre una placa de calentamiento y se extrajo a una velocidad de 6 ciclos/h durante un periodo de 2 horas. Una vez terminada la extracción, se retiró el equipo Soxhlet y se terminó de evaporar el disolvente. El matraz de extracción libre de disolvente se colocó en el desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente, finalmente se pesó el matraz de extracción y se recolectó el aceite utilizado para la prueba.

#### **6.3.5. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las semillas de *M. oleífera* con y sin extracción del aceite sobre *E. coli*, *Pseudomonas auroginosa*, *Candida albicans* y *Staphylococcus epidermis***

Las pruebas iniciales de determinación de la mínima concentración inhibitoria de *E. coli* con *MoSe* con y sin extracción de aceite, esta fase es descrita a continuación:



- Se realizó el método de microdiluciones y turbidimetría en el medio de cultivo líquido Mueller Hinton Broth (MHB) para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las semillas con y sin extracción de aceite, así mismo, para evaluar su actividad antimicrobiana.
- Inicialmente se preparó el medio líquido (MHB) en el cual se inoculó *E. coli* después de estar previamente cultivada en agar Chromocult durante 24 horas a 37 °C.
- Se prepararon diferentes concentraciones (20, 25, 30, 40, y 50%) de las hojas y de semillas con y sin extracción de aceite en solución PBS (solución buffer de fosfato).
- En una placa MICROTITER se añadieron 100 microlitros de *E. coli* con una longitud de onda ( $DO_{600} = 0.01$ ) a una concentración de bacteria final de  $10^5$  UFC/mL del inóculo final.
- Posteriormente, se incubaron 100  $\mu$ L de cada extracto (con 100  $\mu$ L de solución madre de las bacterias en una placa de polipropileno de 96 pozos durante 15 h a 37 °C y 230 rpm).
- En un lector de microplacas Infinite M200, Tecan Software Magellan®, se realizaron las mediciones de OD (densidad óptica) en el tiempo cero y después del tiempo de incubación (15 h). Para verificar el número de colonias bacterianas viables, las diferentes diluciones se cultivaron en agar Coliform a 37 °C durante 24 h.

#### **6.4. Sistema de biofiltración**

##### **6.4.1. Preparación del material filtrante (corcho)**

- El corcho utilizado como material
- al filtrante fue otorgado por el Instituto de Corcho de Cataluña, España. Se trabajó con dos tamaños de partícula (5 mm y 3 cm) mayor y menor tamaño respectivamente. Inicialmente se realizó una limpieza previa con ácido clorhídrico,

hidróxido de sodio y etanol (grado analítico), consecutivamente se realizaron tres enjuagues con agua destilada para retirar sedimentos del material.

#### **6.4.2. Proceso de funcionalización del extracto de las semillas de *M. oleífera* con corcho**

Inicialmente se tamizó las semillas de *M. oleífera* obteniendo un tamaño de partícula de 0.86 mm, posteriormente se realizó la solución stock a dos concentraciones de 10 y 20 % y 0.85% de NaCl. Antes de funcionalizar el extracto de las semillas se preparó el corcho, este material filtrante inicialmente fue sometido a un proceso de limpieza con ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y etanol (grado analítico), consecutivamente se realizaron tres enjuagues con agua destilada para retirar sedimentos del material. Se trabajó con dos tamaños de partícula (3 mm y 5 cm) menor y mayor tamaño respectivamente. El material se secó a una temperatura de 50 °C durante 12 horas, consecutivamente se esterilizó y se le adicionó 200 mL de la solución stock de las semillas, se puso en agitación con un magneto observándose que la solución cubriera el material filtrante durante 2 horas, posteriormente se realizó el enjuague del material con agua destilada hasta retirar parte de la solución y se secó a 50 °C durante 12 horas. A continuación, en la Figura 7 se observa parte del proceso de funcionalización del corcho.



**Figura 7.** Funcionalización del extracto de las semillas de *M. oleifera* con corcho.

### **6.5. Diseño experimental fraccionado $2^{7-4}$ utilizando corcho como material filtrante**

- Se seleccionó las 2 mejores concentraciones inhibitorias (mayor y menor) de MoSe con y sin extracción de aceite e infusión de las hojas sobre *E. coli* donde se realizará un diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  Ver Tabla 9. Los factores fijos son: recirculación, aireación, concentración de las semillas, salinidad, tiempo de retención hidráulica, tamaño de partícula del corcho y tiempo de lisis.

**Tabla 9.** Factores independientes y sus valores bajo y alto del diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  para la reducción de *E. coli* en los biofiltros percoladores funcionalizados con el extracto de *M. oleifera*.

Factores independientes			Codificados		Naturales	
Recirculación (mL/min)	Rec	A	-1	1	3.33	6.5
Aireación (L/min)	Air	B	-1	1	0	4
Concentración %	Conc	C	-1	1	20	30
Conductividad (µs/cm)	Con d	D	-1	1	800	1500
Tiempo RH (h)	TRH	E	-1	1	6	12
Tamaño de partícula (mm)	TP	F	-1	1	3	5
Tiempo de lisis (horas)	TL	G	-1	1	2	3

Números sin codificar: Nivel alto (1) y Nivel bajo (-1)

A continuación, en la Tabla 10 se encuentran la matrix entre los factores independientes

**Tabla 10.** Matriz del Diseño experimental fraccionado  $2^{7-4}$

Tratamientos	A	B	C	D	E	F	G
T1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
T2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
T3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
T4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
T5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
T6	1	-1	1	1	1	-1	-1
T7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
T8	1	1	1	1	1	1	1

La combinación de cada factor fue:  $D=A*B$ ;  $E=A*C$ ;  $F=B*C$ ;  $G=A*B*C$

Consecutivamente, el mejor tratamiento obtenido del diseño experimental se someterá a la técnica molecular de vqPCR para detección de viabilidad de *E. coli*.

A continuación, se observa el proceso del corcho previamente a la extracción del ADN presente en el biofilm generado alrededor del mismo, realizándose un proceso de sonicación para liberar el biofilm del material, posteriormente, se realiza una centrifugación de 1000 rpm durante 20 minutos y se obtiene la biomasa para la extracción de ADN mediante un kit. En la Figura 8, se evidencia el proceso de obtención de biomasa del corcho y los pasos para el proceso de extracción del ADN y amplificación del gen *LacZ*.



**Figura 8.** Proceso de recolección de biomasa del corcho para proceso de extracción de ADN. Corcho con biomasa de *E. coli* (a); centrifugación de la biomasa (b); recolección de la biomasa (c); extracción y purificación del DNA (d); capilares para la prueba qPCR (e).

- **Sistema de biofiltración con cartuchos filtrantes**

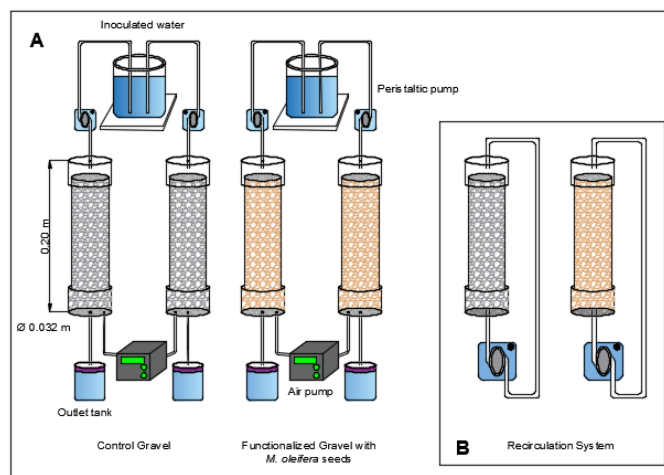
Para la construcción del sistema de cartuchos filtrantes se utilizaron tubos de PVC (diámetro 0.032 m; longitud 0.20 m), limitados en el extremo superior por una rejilla de polietileno ( $0.0808 \text{ m}^2$ ) y dos agujeros en el extremo inferior por una pieza de geotextil. El cartucho filtrante se encerró adicionalmente por dos tapones (diámetro 0.032m) unidos a una sección de tubería de polietileno (diámetro 0.06 m) (Figura 9). El tubo superior se conectó a la bomba peristáltica Etatron, ET-PBV4336574, que a su vez se conectó con el depósito de entrada (afluente) que se agitaba constantemente a 250 rpm; la parte inferior del tubo permitía la recolección del agua tratada en el contenedor del efluente y la entrada de aireación al sistema. Cada cartucho filtrante tenía la capacidad volumétrica de 160

mL, de los cuales 110 mL correspondían al volumen desplazado por el corcho, por lo tanto, se tenía un volumen útil de 50 mL.



**Figura 9.** Sistema de biofiltración utilizando cartuchos de PVC.

Los cartuchos filtrantes se organizaron en un sistema de dos filtros (Figura 10), uno lleno con corcho fuincionalizado con *MoSe* y otro con corcho sin funcionalizar (control). Para determinar la eficiencia de la inhibición de *E. coli*, el flujo del afluente se dividió en partes iguales entre los cartuchos con un caudal constante de 3.33 mL/min.



**Figura 10.** Esquema del sistema de biofiltración funcionalizado con extracto de semillas de *M. oleifera*. Experimentos con bomba de aire (a); sistema de recirculación del agua (b).

## 6.6. Prueba de confirmación de lisis celular bacteriana

### 6.6.1. Prueba live/dead INVITROGEN

La técnica fue realizada en la universidad autónoma de Barcelona en el departamento de genética (Figura 11). Para probar las propiedades antimicrobianas de las semillas de la grava y el corcho funcionalizado, la cepa de la bacteria *E. coli* ATCC 8739 aislada de un apantle de Xochimilco, se cultivó en agar TSB a 37 °C durante 12 horas con una concentración de  $10^5$  bacterias/mL. Adicionalmente, se utilizó una solución de PBS en las etapas del experimento de la funcionalización de la grava para minimizar la lisis de las bacterias. Las muestras se tiñeron con un kit de tinción doble BacLight. Para determinar la viabilidad de adheridos y bacterias sin adherir. BacLight emplea dos tinciones de ácido nucleico: verde Tinción fluorescente de SYTO 9 y tinción fluorescente roja de yoduro de propidio. Estas manchas difieren en su capacidad para penetrar en células bacterianas sanas. El tinte SYTO 9 puede penetrar en todas las bacterias, mientras que el yoduro de propidio puede penetrar solo las bacterias con membranas dañadas (Huda et al. 2012).



**Figura 11.** Filtración, fijación de las células bacterianas con la tinción SYTO9 y yoduro de propidio.

### 6.6.2. Prueba citometría de flujo

Las bacterias se analizaron con un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) equipado con un láser azul de argón (488 nm) configurado a 15 mV. Todos los filtros fluorescentes y detectores utilizados fueron los equipos estándar de la máquina, con fluorescencia verde recogida en el canal FL1, fluorescencia naranja recogida en el canal FL2 y la fluorescencia roja recolectada en el canal FL3 (670 nm). Todos los parámetros fueron recogidos como señales logarítmicas. Generalmente, se adquieren los datos a baja velocidad (aprox. 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), y la concentración de la muestra se ajustó a conteo por debajo de 1,000 eventos  $\text{s}^{-1}$  con agua MilliQ. Se calibró la microesfera fluorescente (cuentas de látex Polysciences de color amarillo-verde de 0,92- $\mu\text{m}$ ). Se agregó la solución de cada muestra como referencia interna con una concentración de población de  $10^6$  cel/ml, la concentración se estimó con el software CellQuest y PaintAGate (Becton Dickinson, Palo Alto, CA), (Falcioni et al. 2008).

### 6.6.3. VqPCR de viabilidad de las concentraciones seleccionadas de las pruebas del extracto de las semillas de *Moringa* con y sin aceite e infusión de las hojas sobre la inhibición de *E. coli*

Para la consecución de la vqPCR se realizaron los siguientes pasos preliminares:

#### 6.6.3.1. Identificación molecular de la cepa presuntiva de *E. coli*

La secuenciación del gen 16s ARNr fue realizada por el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV con el cual se obtuvieron dos secuencias por cada oligonucleótido. Las secuencias fueron editadas manualmente por medio del programa Chromas 2.2 (2012) conformando una secuencia consenso, por cada aislamiento. Las secuencias consenso de cada una



de las muestras se comparó con el programa nucleotide BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para determinar las similitudes entre secuencias biológicas.

### 6.6.3.2. Selección del gen de *E. coli* ATCC 8739

Para realizar las pruebas de PCR de viabilidad se seleccionó un gen específico y expresado constantemente en el ADN de la bacteria la cual se someterá a la prueba de viabilidad, para esto se realizó una búsqueda bibliográfica con estudios similares donde desarrollaron la técnica molecular de vqPCR para la misma cepa de *E. coli* ATCC 8739 donde se evidenció que el gen que se encuentra constitutivamente en el ADN de la cepa bacteriana es **LacZ (beta-D-galactosidasa)** con sus respectivos primers (FORWARD y REVERSE) como se observa en la Figura 12 del estudio de Foulds et al. (2002).

Oligonucleotide Sequences Used for Real-Time PCR Analysis of Waterborne Microbes

Target <sup>a</sup>	Oligo <sup>b</sup>	Sequence (5' to 3')	Final concentration (nM)
eaeA	F	aataactgcttggattaaacagacatct	900
	R	ggaagagggttttgtgtattagggt	900
	P	aagtgcttgatactccagaacgctgctca	200
lacZ	F	ggatctgccattgtcagacatg	300
	R	ctgttgactgtagcggctgatg	300
	P	taccccgtagctcttcccgagcg	200
mcyA	F	cgaccgaggaatttcaagct	50
	R	agtatccgaccaagttaccctaac	300
	P	ttaaatcggaattatcccagaaaatgccgt	200

<sup>a</sup>eaeA encodes intimin (X60439). lacZ encodes β-galactosidase (V00296). mcyA (AB019578) is in the microcystin synthetase operon; these oligos were presented in Foulds et al. and were named MISY.<sup>9</sup>

<sup>b</sup>Forward (F) and reverse (R) primers and dual-labeled hydrolysis probe (P). The probe for eaeA was 5' labeled with JOE, and the lacZ and mcyA probes were 5' labeled with FAM. Probes were quenched with TAMRA or 3' BHQ-1 (Biosearch Technologies, Inc.).

Figura 12. Primers forward y reverse del gen *LacZ*

### 6.6.3.3. Extracción del ADN

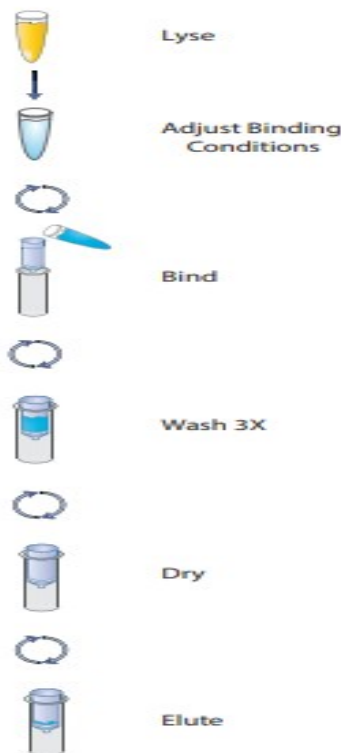
- Inicialmente se sometió la bacteria a incubación durante 12 horas en medio TSB a 37 °C, consecutivamente se centrifugó y se pesó 0.03 g de biomasa de *E. coli*.
  - Una vez disponemos de las suspensiones celulares sometidas al tratamiento deseado, estas ya están listas para la extracción del material genético. EL ADN genómico (gADN) de las células se extrajo utilizando el *kit* de extracción de ADN para tejido celular, en el presente estudio se utilizó el kit E.Z.N.A descrito a continuación:
- 
- Se pesó 30 mg de biomasa y transfirió en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
  - Se añadió 200 µL de tampón TL buffer.
  - Se añadió 25 µL de solución de proteasa OB y se mezcló con Vortex.
  - Se incubó a 55 °C en un baño de agua con agitación.
  - Se agregó 4 µL de ARNasa A (100 mg / ml) por 30 mg de tejido.
  - Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
  - Centrifugó a la velocidad máxima ( $\geq 10,000 \times g$ ) durante 5 minutos.
  - Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL.
  - Se agregó 220 µL BL Buffer. Se ajustó el volumen de BL Buffer en función de la cantidad de inicio y se mezcló con Vortex para mezclar bien.
  - Se incubó a 70 °C durante 10 minutos.
  - Se añadió 220 µL de etanol al 100%. Se ajustó el volumen de etanol requerido basado en la cantidad de material de partida y se mezcló con Vortex.
  - Se insertó una mini columna de ADN HiBind® en un tubo de recolección de 2 mL.
  - Se transfirió toda la muestra del Paso 9 a la Mini Columna de ADN HiBind®, incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado.
  - Se centrifugó a la velocidad máxima durante 1 minuto.
  - Se desechó el filtrado y se reutilizó el tubo de recogida.
  - Se añadió 500 µL de HBC Buffer. El tampón HBC se diluyó con 100% de isopropanol antes de su uso.
  - Se centrifugó a velocidad máxima durante 30 segundos.
  - Se desechó el filtrado y el tubo de recogida.

- Se insertó la mini columna de ADN HiBind® en un nuevo tubo de recolección de 2 mL.
- Se añadió 700 µL de tampón de lavado de ADN. (El tampón de lavado de ADN se diluyó con etanol al 100% antes de su uso)
- Se centrifugó a velocidad máxima durante 30 segundos. (Se desechó el filtrado y se reutilizó el tubo de recogida).
- Repetir los Pasos 18-20 para un segundo paso de lavado con Tampón de lavado de ADN.
- Se centrifugó la mini columna vacía de ADN de HiBind® a la velocidad máxima durante 2 minutos para secar la columna. (Este paso es crítico para la eliminación de trazas de etanol que pueden interferir con aplicaciones posteriores).
- Se transfirió la mini columna de ADN HiBind® a una microcentrífuga 24.
- Se añadió 100-200 µL de tampón de elución calentado a 70 °C.
- Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto.
- Se repitieron los pasos 24-26 para un segundo paso de elución. (Cada elución de 200 µL producirá típicamente un 60-70% del ADN unido a la columna). Por lo tanto, dos eluciones generalmente rendirán ~ 90%. Sin embargo, aumentando la elución. El volumen redujo la concentración del producto final. Para obtener ADN a mayor concentración, la elución se llevó a cabo utilizando 50-100 µL de elución

Buffer (que redujo el rendimiento total de volúmenes redujeron los rendimientos.

- Se almacenó el

En la figura 13, se del proceso para ADN *E. coli*.



ligera mente el de ADN). Los inferiores a 50 µL considerablemente

ADN eluido a -20 °C.

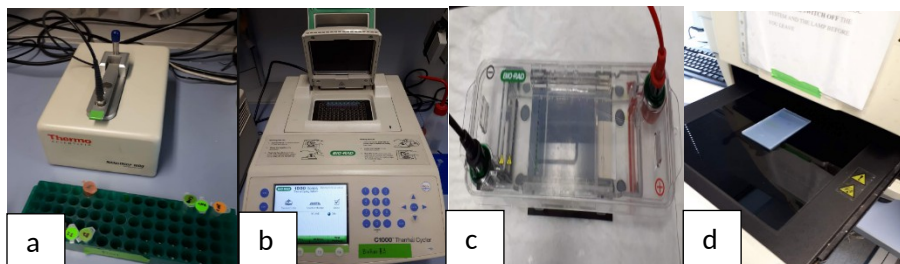
observa el esquema la extracción del

**Figura 13.** Proceso de extracción de ADN de *E. coli*.

#### **6.6.3.4. Amplificación del gen *LacZ***

La amplificación del gen *LacZ* se realizó mediante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) con las condiciones ya establecidas por el estudio de Ferreira et al. (2011) en el laboratorio de biología molecular del Centro Mediterráneo de Investigaciones Marinas y Ambientales (CMIMA). La PCR se hizo en un volumen final de 50  $\mu$ L conteniendo: 50-500 ng de ADN (concentración medida con un nanodrop 1000), 1 U Taq ADN polimerasa, 200 mM dNTP, 1-2 mM  $MgCl_2$ , 10X PCR buffer y 20 pmol de cada primer. Para lograr una temperatura óptima común para todos los pares de primer, las reacciones fueron probadas en gradientes de temperatura de 40 °C a 60 °C, según la posición de los recipientes en el termociclador (termociclador C1000 Thermal Cycler). El proceso consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos que abarcan tres pasos consecutivos de 45 segundos a 94 °C, 56 °C, y 72 °C. Por último, la extensión a 72 °C durante 10 minutos. Las amplificaciones obtenidas

fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con SYBR™ safe (Invitrogen) (0.5 µg/mL) para el análisis. A continuación, en la Figura 14 se observa el proceso de la amplificación del gen *LacZ*.



**Figura 14.** Proceso de amplificación del gen *LacZ*. Cuantificación del ADN (a); Amplificación del gen (b); Electroforesis en gel de agarosa (c); Foto documentador de geles (d).

#### 6.6.3.5. Condiciones de la PCR para el gen *LacZ*

A continuación, en la Tabla 11 se encuentra la secuencia de los primers utilizados para la amplificación del gen *LacZ* y el tamaño del producto de PCR.

**Tabla 11.** Secuencia de primers gen *LacZ*

Gen	Primer Forward 5'-3'	Primer Reverse 5'-3'	Longitud del amplicón	Referencia
<i>LacZ</i>	GGATCTGCCAT TGTCAGACATG	CTGTTGACTGTAG CGGCTGATG	142 pb	Foulds et al. 2002

#### 6.6.3.6. Condiciones para la preparación de la mix de PCR

A continuación, se presentan los reactivos necesarios para la preparación de la Mix de PCR necesarios para la amplificación del Gen *LacZ* de *E. coli*, como se observa en la tabla 12.

**Tabla 12.** Reactivos necesarios indicados para elaborar el mix:

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
Buffer	2.5 $\mu$ L	10x
MgCl <sub>2</sub>	0.75 $\mu$ L	2 mM
dNTPS	0.5 $\mu$ L	200 mM
Primer Forward	1 $\mu$ L	20 pmol
Primer Reverse	1 $\mu$ L	20 pmol
Taq polimerasa	0.2 $\mu$ L	1 U
Agua Mili-Q	17.5 $\mu$ L	-
ADN molde	2 $\mu$ L	50-500 ng
Volumen total por reacción de PCR	33 $\mu$ L	

Volúmenes por muestra, se multiplica por el número de muestras que se van a usar para saber el volumen total de la mix.

A continuación, en la tabla 13 se indica la concentración de dNTPS para completar la elaboración de la Mix.

<b>Stocks de dNTPS (10 mM)</b>	60 $\mu$ L MQ	10 $\mu$ L A	10 $\mu$ L T	10 $\mu$ L C	10 $\mu$ L G
<b>Stocks de primers (10 <math>\mu</math>M)</b>	Forward		90 $\mu$ L MQ		
			10 $\mu$ L de primer		
	Reverse		90 $\mu$ L MQ		
			10 $\mu$ L de primer		

**Tabla 13.** Reactivos necesarios indicados para elaborar el mix:

A continuación, en la Tabla 14 se encuentra la secuencia de los primers utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA y el tamaño del producto de PCR.

**Tabla 14.** Primers utilizados para la amplificación del gen 16S ARNr y longitud del amplicón

Gen	Primer Forward 27F	Primer Reverse 1492 R	Longitud del amplicón	Referencias
16S ARNr	AGAGTTTGATC CTGGCTCAG	GGTTACCTTGT TACGACTT	1492-1513 pb	James et al. 2006

#### 6.6.3.7. Procedimiento de la PCR para 16S ARNr

A continuación, en la tabla 15 se encuentran los reactivos para la elaboración de la mix sobre la amplificación del 16 ARNr.

**Tabla 15.** Reactivos necesarios indicados para elaborar el mix:

Reactivos	Volumen	Concentración
Buffer	2.5 µL	10x
MgCl <sub>2</sub>	0.75 µL	2 mM
dNTPS	0.5 µL	200 mM
Primer Forward	0.5 µL	20 pmol
Primer Reverse	0.5 µL	20 pmol
Taq polimerasa	0.125 µL	1 U
Agua Mili-Q	18.5 µL	-
ADN molde	2 µL	50-500 ng
Volumen total por reacción de PCR	25.4 µL	

#### 6.6.3.8. Concentración de la muestra y tratamiento con el PMA

Inicialmente se realizó la suspensión bacteriana presente en las muestras y se concentraron mediante la técnica de centrifugación. Así mismo, se realizó 3 lavados de la biomasa bacteriana con PBS (Regulador de fosfato y sales) consecutivamente, el tratamiento con PMA es aquel que nos servirá, en la vqPCR, para diferenciar las células vivas de las muertas en una muestra y poder determinar que los resultados de la amplificación corresponden a células viables.

A continuación, está descrito el procedimiento realizado para aquellas muestras donde se agregó el intercalante de DNA Propidio de Monoazide (PMA).

#### 6.6.3.9. Evaluación de la eficiencia de biofiltros funcionalizados del extracto de las semillas de *M. oleifera* con corcho para la eliminación de *E. coli*

Para el uso del PMA se utilizó el KIT PMA Viality blue-V de QIAGEN kit siguiendo sus especificaciones como se describen a continuación en la tabla 16.

**Tabla 16.** Reactivos del KIT PMA Viality blue-V

<b>Kit PMA Viality Blu-V</b>	<b>Concentración</b>
Reactivo PMA	2 x 0.7 mg
Buffer EB	55 mL
RNase-Free Water	1.9 mL

#### 6.7. Preparación y reconstitución con PMA

Se agregó 550  $\mu$ L de agua libre de RNAsa a cada vial de reactivo de PMA, para obtener 2.5 mM de Solución de PMA. Se homogenizó pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces o agitando el tubo 4–6 segundos y se centrifugó brevemente. El PMA es un reactivo fotorreactivo y se almacenó en refrigeración entre 2 a 8 °C el reactivo reconstituido en tubos no transparentes para evitar la exposición a la luz.



### **6.7.1. Controles de ensayo relevantes**

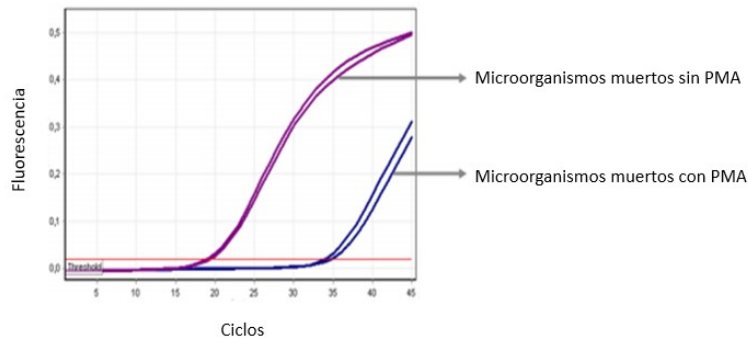
#### **Sin muestra de control de PMA**

La muestra de control sin PMA se implementó en cada experimento (para cada patógeno objetivo y/o cada matriz) para evaluar el efecto de enmascaramiento de ADN de PMA en las muestras de prueba. Cuando las muestras de prueba se preparan a partir de la muestra original de la solución, que contiene una mezcla concentrada de células vivas y muertas del objetivo organismo, una muestra se retiene para servir como la muestra de control sin PMA. Es configurar como una muestra de prueba normal y ejecuta todo el flujo de trabajo con la única diferencia es que no se trata con el reactivo PMA.

#### **Muestras de control de células muertas**

Para verificar y visualizar el máximo efecto de enmascaramiento de PMA para tipo de muestra respectivo, se configuraron dos muestras separadas como control de células muertas de las muestras. Los patógenos contenidos en estas muestras se matan por calor durante 10 minutos a 70 °C y expuesto a sacudidas permanentes en un termo-agitador. Una muestra se trató térmicamente y se realizó todo el flujo de trabajo con PMA añadida. La otra muestra se ejecutó en todo el flujo de trabajo sin agregar PMA. El último representando el análogo tratado térmicamente del control regular sin PMA.

La purificación y la amplificación exitosas del control sin PMA deberían resultar en una diferencia de CT de >6 entre la amplificación del tratamiento térmico y el tratamiento con PMA muestra y la muestra sin control de PMA sin calor (cuando Buffer EB es usado). Por lo tanto, la señal de PCR en tiempo real de las muestras de control sin PMA sirve como punto de comparación necesario para observar el cambio de señal inducida por PMA (Figura 15).



**Figura 15.** Ejemplo de diagrama de amplificación de máxima eficiencia de enmascaramiento de PMA.

### 6.7.2. Procedimiento 1 - preparación de controles

- Preparar 2 ml con 1 ml de solución de muestra para cada grupo de muestras homogéneas para las muestras de control de células muertas.
- Cerrar los tubos, etiquete un tubo como "Dead + PMA" y el otro tubo como "Dead No PMA".
- Poner la bacteria durante 10 minutos a 70 ° C en un termomezclador o agite el agua y déjelos enfriar a temperatura ambiente.
- Tratar el tubo "Dead + PMA" de acuerdo con el flujo de trabajo normal; tratar el tubo "Dead No PMA" de acuerdo con las descripciones para el "Control sin PMA muestra". Este control de células muertas mostrará la capacidad máxima de PMA de enmascaramiento.

### 6.7.3. Procedimiento 2 - procesamiento de muestras de prueba

- Agregar 1 ml de solución de muestra que contenga una mezcla concentrada y organismo objetivo muerto en un Micro Tubo SafeSeal de 2 ml.

- Centrifugar el tubo durante 5 minutos a 13,000 x g.  
Nota: Para cada experimento, implemente al menos una muestra adicional con muestra control de PMA. El valor CT de la muestra de control Sin PMA proporciona un punto de comparación para determinar el cambio de señal inducida por PMA que indica la presencia de microorganismos muertos. Retire y deseche el sobrenadante.
- Agregar 500 µl de Buffer EB al sedimento del organismo objetivo, cierre la tapa del tubo, y resuspender el sedimento mediante un breve y vigoroso vórtice.  
Nota: Buffer EB mejora la sensibilidad de los organismos muertos a la PMA reactivo, apoyando así de manera eficiente la reacción global de enmascaramiento de PMA.
- Agregar 10 µl del reactivo PMA reconstituido a las muestras. No agregue PMA reactivo para la muestra de control Sin PMA (ver paso 1) y el calor matado muestra etiquetada "Dead No PMA". Tape bien los tubos y mezcle Vortex o invertir los tubos varias veces.
- Colocar las muestras con PMA en un 10. Coloque los tubos en las posiciones de muestra de la caja de incubación, cierre la tapa, e incubar las mezclas durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- Después de la incubación, transferir los tubos de muestra a las posiciones de muestra del Sistema BLU-V e iluminar la solución de muestra-PMA durante 10 min (Figura 16). Vórticear tubos de muestra dentro del sistema BLU-V aproximadamente cada 2 minutos para permitir una iluminación de muestra homogénea.



**Figura 16.** Sistema BLU-V de iluminación de muestras con PMA

#### **6.7.4. Ensayo de viabilidad (VqPCR) con tratamiento de PMA**

A partir del diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  se seleccionó el tratamiento 2 con los siguientes factores: rec (6.5 mL/s), sin aireación, concentración del extracto de las semillas de *M. oleífera* (10 mg/L) conduc (800  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ) TRH (6 horas), TP (5 cm) y 2 horas de TL. A esta solución se ajustó una concentración celular de  $10^6$  células/mL de *E. coli* con una longitud de onda de 600 nm en un volumen final de 50 mL. Esta suspensión bacteriana se agregó al sistema de biofiltración funcionalizado con MoSe.

El presente estudio realizó el ensayo de viabilidad con 2 tiempos (0 y 6 horas). Por cada tiempo del ensayo las muestras se dividieron como: sin tratamiento (SIN PMA) y con tratamiento (CON PMA). A continuación, en la Tabla 17 se describen las muestras del ensayo.

**Tabla 17.** Ensayo de viabilidad de las muestras del biofiltro con corcho funcionalizado del extracto de las semillas de *M. oleifera*

Muestras	PMA (10 µL)	
Control	-	+
R1	-	+
R2	-	+
CBMS	-	+
CBVS	-	+

(-) ausencia de PMA, (+) presencia de PMA, CBMS (Control de bacterias muertas de la suspensión de la solución) y CBVS (Control de bacterias vivas de la suspensión de la solución).

#### 6.7.5. VqPCR (Extracción de DNA)

Una vez disponemos de las suspensiones celulares sometidas al tratamiento deseado, estas ya están listas para la extracción del material genético. EL ADN genómico (ADNg) de las células se puede extraer utilizando *kits* de extracción de DNA comercializados por varias empresas que ofrecen una amplia gama en función del tipo de células con las que se va a trabajar, su procedencia, etc.

En este caso se seleccionó el kit *DNeasy PowerWater* ya que las muestras de trabajo son muestras de agua. Previamente a la extracción del ADN las células se someterán a un choque térmico para facilitar la lisis celular (15 min a 99 °C i 15min a 0 °C x2).

#### 6.7.6. Amplificación del gen del ADN

La técnica de la PCR, las siglas en inglés de “*Polymerase Chain Reaction*” es una técnica de amplificación molecular de ácidos nucleicos que se fundamenta en la característica intrínseca de las ADN-polimerasas para replicar hebras de ADN a partir de un molde. Dentro de la técnica de la polimerización son necesarios los

siguientes componentes: Muestra de DNA, *Primers*, tampón ( $MgCl_2$ ), Nucleótidos (dNTPs), Nucleótidos (dNTPs) y polimerasa.

Esta técnica molecular consta de 3 etapas como se aprecia en la tabla 18, se compone de tiempos y temperaturas distintas. Estas conforman lo que llamamos 1 ciclo de PCR que se repite un promedio de entre 30 y 40 veces.

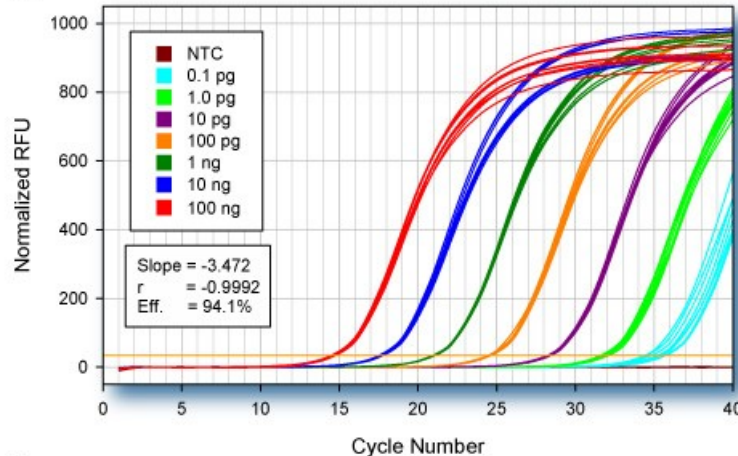
**Tabla 18.** Etapas de un ciclo de PCR.

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización	95°C	30'' – 1'
Alineamiento	Depende totalmente de la <i>T<sub>m</sub></i> de los <i>primers</i> , concretamente 5 °C por debajo de esta. Aproximadamente 55 °C.	20'' aprox
Elongación	70-72 °C	2 min

Una vez finalizada la PCR, se extraen las muestras amplificadas y se cargan en un gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio (EtBr) al que se aplica corriente para observar los resultados. El ADN tiene carga negativa y va a migrar hacia el polo positivo del gel.

#### **Curva estándar:**

La curva se crea a partir de una serie de diluciones de ADN de concentraciones conocidas y se usa para determinar la concentración de material genético inicial presente en las muestras a analizar. Los estándares se amplifican a la vez que las muestras (Figura 17).



**Figura 17.** Representación de la amplificación de una curva estándar.

### Preparación del estándar qPCR a partir del organismo de referencia *E. coli*

La curva estándar se realizó siguiendo las especificaciones del estudio realizado por Foulds et al. (2002) con algunas modificaciones.

- Se sembró *E. coli* en cultivo TSB y se puso a crecer durante 4 horas a 37 °C con una agitación de 200 rpm.
- Se realizaron 3 lavados de la biomasa con PBS (Buffer fosfato y sales) mediante centrifugación, consecutivamente se alcanzó una OD 600nm preciso de 1.0 (este valor corresponde a  $5 \times 10^8$  células por mL). Se utilizó un volumen final de 50 mL.
- Se realizó una serie de diluciones con 8 unidades ( $5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^1$  células por mL).
- Se retiró 100  $\mu$ L de cada dilución y transfirieron a placas de Petri usando el medio de cultivo coliform.
- A partir de cada dilución con el volumen final de 50 mL se centrifugó para recolectar la biomasa y se realizaron las extracciones de DNA.
- Se midieron las muestras a través de qPCR por triplicado
- Se creó una curva estándar a partir de CFU y el valor Ct correspondiente.

### 6.7.7. qPCR: PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. La principal ventaja que presenta la qPCR en comparación con la PCR convencional es que permite la monitorización a tiempo real de la cantidad de cadenas de ADN que se están produciendo al final de cada ciclo, sin tener la necesidad de interrumpir el proceso ni de esperar a su finalización. Esto es gracias a la incorporación en la *mix* de sistemas de fluorescencia.

### 6.7.8. Mix de sistemas de fluorescencia

Los agentes intercalantes son moléculas fluorescentes que se añaden a la *mix* de la qPCR y que se incorporan a la nueva cadena de ADN a medida que la polimerasa la va sintetizando. Estos aumentan la emisión de fluorescencia al pasar a formar parte de la doble cadena de DNA. El aparato excita el fluoróforo y detecta la fluorescencia.

### 6.7.9. Cuantificación Absoluta

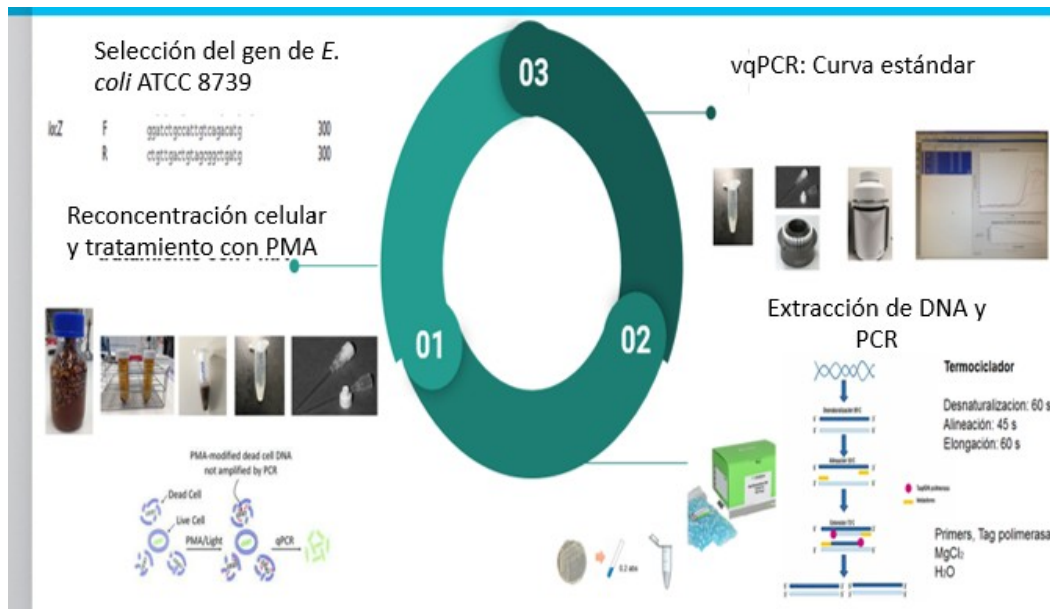
La cuantificación absoluta describe un experimento de qPCR en el que unas muestras de concentración conocida son diluidas de forma seriada y posteriormente amplificadas para generar una curva *standard*. Las muestras problema se cuantificarán por comparación con esta.

Si la serie de diluciones ha sido preparada correctamente, se va a obtener una recta (Ct vs. Log *standard*) que servirá para medir la cantidad de ADN presente en la muestra problema tan solo comparando los Ct obtenidos (extrapolación de valores).

Ambas muestras de ADN, conocida y problema, deben tener secuencias iguales o muy similares.



En la figura 18, se observa un esquema general de la metodología de la técnica de viabilidad para la realización de la vqPCR.



**Figura 18.** Esquema del proceso del ensayo de desinfección con el extracto de las semillas de *M. oleifera*.

### 6.7.10. Procedimiento de la qPCR

#### Paso 1: Preparación de la mix de qPCR

A continuación, en la tabla 19 se proporcionan los reactivos necesarios para la realización de la prueba

**Tabla 19.** Reactivos necesarios indicados para elaborar la mix:

REACTIVOS
Mix Plus de qPCR 5x HOT FIREPol®
EvaGreen®
ADN molde
Agua PCR

Los primers se obtuvieron del proveedor metabion y se realizaron de acuerdo con las indicaciones del comerciante, las características se encuentran en la tabla 20.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Tm	Longitud ampliación	Referencias
Lac Z	GGATCTGCCA	CTGTTGACT	52 °C	352 pb	Foulds et al. 2002
	TTGTCAGACA TG	GTAGCGGCT GATG			

**Tabla 20.** Características del gen *Lac Z* de *E. coli* ATCC 8709

#### Procedimiento:

- Se esterilizan los capilares con UV durante 20 min en la cabina Telstar Bio II
- Se realiza la mix y se homogeniza en el vortex (dentro de la zona limpia).

**Tabla 21.** Concentraciones de trabajo de los primers, partiendo de una solución madre de ambos primers de concentración 100 µM.

	Volumen inicial	Agua PCR	Volumen final	Concentración final
<b>Primer forward</b>	0.5 µL	99.5 µL	100 µL	0.5 µM
<b>Primer Reverse</b>	0.5 µL	99.5 µL	100 µL	0.5 µM

**Tabla 22.** Volúmenes para un capilar, se multiplica por el número de capilares que se van a usar para saber el volumen total de la mix.

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
<i>Mix Plus de qPCR 5x HOT</i>	4 µL	1x
<i>FIREPol® EvaGreen®</i>		
Primer Forward	0.3 µL	0.5 µM
Primer Reverse	0.3 µL	0.5 µM
Agua PCR	10.4 µL (Hasta 20 µL)	-
ADN molde	5 µL	-
Volumen total por reacción		20 µL

---

---

de qPCR

---

En cabina Telstar Bio II (cabina blanca):

- Se añadirá 15 µL de la mix y 5 µL del ADN molde en el capilar.
- De cada muestra se realizará dos muestras directas y dos diluidas (1/10)
- Añadir el control negativo (NTC), añadiendo 5µl de agua de PCR en lugar de ADN.

En cabina Telstar AV30/70 (cabina verde):

- Se añadirá el control positivo: se trata de un estándar correctamente cuantificado (en congelador -20 °C)
- Generar un pulso a todos los capilares en la microcentrífuga a 60 rpm con el adaptador para capilares.

**Paso 2: Realización de la qPCR**

La qPCR se realizó con el termociclador LigthCycler 1.5. Con el programa de la qPCR (Light Cycler software 4.0) se programarán los ciclos.

- Para acceder al programa se tendrá que introducir el usuario y la contraseña (usuario: admin; contraseña: master).
- Una vez ejecutado el programa Lightcycler Software 4.0 crear un experimento nuevo.

Ruta: New → Light Cycler Experiment

Especificar la siguiente configuración en la **ventana Run**

**Setup:**

Default Channel, 530

Seek Temperature, 30

Max Seek Position (número de muestras)

Instrument type, 3 channels

En la **ventana Samples** especificar el tipo de análisis:

Ruta: Analysis type → Absolute Quantification

Una vez especificada la cuantificación absoluta especificar el tipo de muestras

En la **ventana Sample type** nombrar a las muestras como:

- Muestras → unknown
- Control positivo → Standard (especificar su concentración)

De esta forma se cuantifican las muestras con una curva estándar externa.

En la **ventana Run** se especifican los ciclos de temperatura propios de cada gen a cuantificar además de especificar el modo de análisis (hace referencia a cómo y cuándo se realiza la medida de la fluorescencia).

**Tabla 23.** Ciclos de temperaturas para el gen *LacZ* y el modo de análisis.

<b>1 ciclo</b>		<b>Analysis mode</b>	<b>Acquisition mode</b>
95 °C	15 minutos	None	None
<b>45 ciclos</b>			
95 °C	30 segundos	None	None
60 °C	1 minuto	None	<b>SINGLE</b>
72 °C	20 segundos	None	None
<b>1 ciclo</b>			
95 °C	0 segundos	Melting curves	None
52 °C	0 segundos	Melting curves	None
97 °C	0 segundos	Melting curves	Continuos
<b>1 ciclo</b>			
40 °C	20 segundos	None	None

Finalmente se realizan los ciclos en Start Run y se espera a que el quipo haga las comprobaciones antes de empezar los ciclos.

### **Paso 3: Obtención de resultados**

Una vez acabada la qPCR, se accede a: Analysis → Amplification Analysis → Absolute Quantification.

Finalmente se añade la curva estándar (Standard curve (In Run)), especificando *use external* y escogemos la curva del gen 16S. El equipo genera los resultados por reacción, es decir cuantifica las copias genómicas que hay en 5 µL. Si se quiere dar los resultados en CG/g de biofilm hay que aplicar factores de conversión.

#### **6.8. Evaluación del efecto de *M. oleifera* en la remoción de plaguicidas de un agua sintética**

- Con el fin de definir el agua sintética, previamente se caracterizará el agua de la chinampa evaluando parámetros fisicoquímicos y se realizará la identificación del plaguicida mediante un método estándar para la evaluación de aguas residuales, el método que se realizará es el 6630 B (Extracción líquido-líquido) y se compararan los resultados con la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud Ambiental, Agua para uso y consumo humano "Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".
- La recolección de las muestras se realizará según la norma NMX-AA-003/1-SCFI-2008 "Guía para el diseño de programas de muestreo y técnicas de muestreo, a las muestras se les realizarán mediciones de los siguientes parámetros: en campo pH, oxígeno disuelto, conductividad, sólidos totales y en el laboratorio se evaluará DQO, DBO, turbidez y se cuantificarán los plaguicidas.
- Se diseñó un agua sintética con una concentración conocida de plaguicidas organoclorados y se sometió a ensayos de biodegradabilidad mediante un diseño de experimentos, este se realizó con el *MoSe* previamente optimizado para la formación de biosurfactantes, diferentes concentraciones del plaguicida organoclorado en el medio líquido con las condiciones de crecimiento de un microorganismo con antecedentes de remoción de compuestos recalcitrantes (plaguicidas, hidrocarburos y plastificantes) por *P. putida* (Parales et al. 2000), proporcionada por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos

Celulares identificada como CDBB-B-100, estas pruebas experimentales se ajustaron según el trabajo realizado por Sarkar et al. (2009).

### **Cinética de crecimiento de *P. putida* para los ensayos de biodegradabilidad de plaguicidas organoclorados**

Inicialmente *P. putida* fue proporcionada por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV identificada como CDBB-B-100, posteriormente se realizaron repiques de la cepa original en medio TSA, se confirmó el género *Pseudomonas* mediante el medio diferencial cetrimide y se realizó una caracterización macroscópica y microscópica.

Para el desarrollo de la curva de crecimiento se sembró la cepa bacteriana en medio mineral durante 24 horas a 37 °C y 120 rpm realizando diluciones seriadas hasta la 10<sup>-6</sup> y se sembrará en medio TSA mediante la técnica de microgota a 37 °C, estas condiciones fueron ajustadas con los estudios realizados por Sarkar et al. 2009.

Una vez realizada la curva de crecimiento se obtuvo el tiempo con mayor concentración celular para continuar con los experimentos de biodegradabilidad del endosulfán.

#### **6.8.1. Determinar el efecto de los MoSe sobre los ensayos de biodegradabilidad del endosulfán por *P. putida* simulando las condiciones de la zona Chinampera**

Previamente a los ensayos de biodegradabilidad se obtuvieron los MoSe, estas semillas fueron proporcionadas por la Universidad Autónoma de Sinaloa del campo de San Miguel Arcángel. Una vez teniendo las semillas se procedió a retirar su cáscara externa con un mortero y se seleccionarán los granos de color blanco crema (semillas libres), estos granos fueron tamizados para generar partículas de semillas de moringa de 2 mm, estas partículas se dispusieron en un

desecador por 24 horas con el fin de asegurar la limpieza y deshidratación de las semillas. Posteriormente, se prepararon soluciones stock a una concentración de 5000 (mg/L) en una balanza analítica se agregaron 5 gramos de partículas de semillas a 1 litro de agua destilada, las soluciones se agitaron inmediatamente por 5 minutos utilizando un mezclador magnético. A estas soluciones se les denominó extractos de semillas de Moringa. (Bichi 2013).

### **6.8.2. Cinética de crecimiento de *Pseudomona putida***

- Se realizó una curva de crecimiento de *P. putida* durante 12 horas en medio mineral con la siguiente composición (0.2 g/100 mL Dextrosa, 2 g/L Sulfato de amonio, 0.1 g/L Sulfato de magnesio y 4 g/L de fosfato de potasio) a 37 °C con 120 rpm, adicionalmente, se midió la absorbancia y la concentración celular con un recuento en placa utilizando la técnica de microgota descrita a continuación:
- A partir de las muestras tomadas en cada tiempo se realizarón diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , cada una de las diluciones se sembró por duplicado en cajas de petri con agar nutritivo.
- Las cajas petri se dividieron en la cantidad de diluciones preparadas y se colocaron tres gotas de cada dilución en la fracción de la caja correspondiente con la ayuda de una micropipeta hasta un volumen entre 8-10  $\mu$ L por gota.
- Las cajas se pusieron en una superficie plana antes de ser llevadas a incubación para permitir que el agar absorba la gota y no se mezclen. La incubación se realizó por 12 horas a una temperatura de 37 °C (Miles y Misra, 1938).
- Posteriormente, se realizaron los recuentos para cada hora contando las colonias dentro de cada gota, el informe de células registradas fue de UFC/mL.

### 6.8.3. Caracterización morfológica de la cepa de *P. putida* CDBB-B-100

Inicialmente *P. putida* fue proporcionada por la colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares del CINVESTAV, que fue identificada como CDBB-B-100, posteriormente se realizaron aislados de la cepa original en medios TSA Polisorbato 80(5 g/L) Hisditina (1 g/L) Peptona de Soja (5 g/L) Sodio Tiosulfato (0,5 g/L) Lecitina (0,7 g/L) Peptona de Caseína (15 g/L) Sodio Cloruro (5 g/L) Agar (15 g/L)) y en Agar Cetrimide ( peptona de gelatina (20 g/L), cloruro de magnesio (1,4 g/L), sulfato de potasio (10 g/L), agar (13,6 g/L), cetrimida (0,3 g/L), glicerina (10 g/L)) los cuales se incubaron a 37°C por 24 horas y se caracterizó macroscópicamente y microscópicamente. La caracterización microscópica se realizó con una tinción de Gram y se observó su morfología gracias al aumento de 100x con un microscopio óptico y su caracterización macroscópica evaluando tamaño, borde, elevación, producción de pigmentos y fluorescencia con ayuda de un estereoscopio.

### 6.9. Diseño experimental y parámetros evaluados

A partir de los resultados obtenidos en un diseño factorial fraccionado  $2^3$  previamente evaluado para determinar la disminución de la TS y la  $E_{24}$  de los MoSe, se seleccionaron los valores que afectaron positivamente estas variables, TS y  $E_{24}$ , entre los que se encuentran la CMC, 700 (mg/L), el tamaño de partícula (0.86 mm) y pH (7).

#### 6.9.1. Preparación del extracto de semillas de *M. oleifera*

Las semillas con corteza fueron proporcionadas por el campo experimental San Miguel Arcángel, ubicado en la población de las Higueras de Jesús María en el Municipio de Culiacán, Sinaloa. Coordenadas Longitud-107°28'15" y latitud de 25°5'23" a 200 metros sobre el nivel del mar.



Seguidamente se dio la obtención de las semillas las cuales fueron trituradas, y se pasaron por un tamiz con un tamaño de entramado de 0,86mm, se pesó 5 g del polvo se dejó en desecación por 24 horas, posteriormente se agregaron los 5 g en agua destilada previamente esterilizada y se dejó reposar por 24h, para finalmente realizar una filtración, para la obtención de un extracto acuoso sin presencia del polvo de las semillas.

### 6.10. Diseño dosis respuesta

Una vez seleccionados los factores más relevantes del diseño factorial fraccionado, se procedió a realizar un diseño de dosis-respuesta, donde se evaluó el comportamiento de *P. putida* en presencia del extracto de *M. oleífera* a 700 mg/L de una solución madre la cual se preparó con las semillas con una concentración de 5000 mg/L y de endosulfán en una concentración de 1 mg/L, adicionados al inicio (hora 0) de la cinética reemplazando la fuente de carbono del medio mineral (Dextrosa 2 g/L, sulfato de amonio 2 g/L, sulfato de magnesio 0.1 g/L y fosfato de potasio 4 g/L) y al inicio de su fase exponencial (hora 5) este dato se obtuvo al realizar una cinética previa de *P. putida* en medio mineral, antes de iniciar el estudio, comparándolos con una cinética control el cual solo presentaba el medio mineral inoculado con *P. putida*; los tratamientos fueron los siguientes:

**Tabla 24.** Tratamientos resultantes del diseño dosis respuesta.

Tratamientos	<i>P. putida</i>	Extracto de <i>Moringa</i>	Endosulfán	Inicio de la cinética	Inicio fase exponencial de la cinética
1	+	+	-	+	-
2	+	+	-	-	+
3	+	-	+	+	-
4	+	-	+	-	+
5	+	+	+	+	-
6	+	+	+	-	+

Los + representa las características presentes en cada tratamiento, y los - los ausentes.

El microorganismo se dejó en un shaker a 37°C por 10 horas a 100 rpm. Se evaluó el crecimiento del microorganismo mediante el recuento de colonias sembradas por la técnica de microgota tomando 6 muestras en los tiempos 0, 2, 4, 6, 8 y 10 en los tratamientos (1, 3 y 5) y en los tiempos 0, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 para los tratamientos (2, 4 y 6).

#### **6.10.1. Determinación de la capacidad de emulsificante**

La capacidad de emulsificante fue evaluada por medio del índice de emulsificación (IE). El índice de emulsificación de los cultivos aislados se determinó mediante la adición de 1mL de diésel y aceite vegetal, y se adicionó a cada tubo 1mL del caldo, se agitó a alta velocidad durante 2 min en vórtex y se dejó reposar durante 24 h. El índice de emulsificación se determinó como el porcentaje de la altura de la capa emulsionada (cm) dividido por la altura total de la columna de líquido (cm). El porcentaje de índice de emulsificación se calculó utilizando la siguiente ecuación (García, 2011):

$$IE = \frac{\text{Altura de emulsión formada (cm)}}{\text{Altura total de la solución (cm)}} \times 100\%$$

#### **6.10.2. Determinación de la tensión superficial**

Para los análisis de tensión superficial se realizaron mediante el método del anillo en un tensiómetro Kruss K6; se utiliza un anillo de platino con geometría muy precisa, cuando es sumergido en el líquido a medir se ejerce una fuerza máxima vertical que es directamente proporcional a la tensión superficial. Cada medición se realizó por triplicado.

#### **6.10.3. Ensayos de biodegradabilidad**

Inicialmente se realizaron los experimentos seleccionando los mejores tratamientos de un diseño factorial fraccionado previamente establecido donde se estudiaron algunos factores como son: la concentración de plaguicida entre 0.5 y 1 mg/L y también se evaluó el efecto de *MoSe* y *P. putida*. A continuación, los mejores tratamientos del diseño factorial fraccionado fue el 2 y el 7 con las siguientes condiciones (tamaño de partícula 0.8 mm, CMC de 700 mg/L, conductividad de 1700 y 8.5 de pH) y (tamaño de partícula de 2, CMC DE 1500, conductividad de 1700 y 8.5 de pH) respectivamente. Estos dos tratamientos fueron seleccionados con el fin de evaluar los ensayos de biodegradabilidad del endosulfán mediante procesos de oxidación y reducción. Finalmente, se realizó un diseño experimental (dosis-respuesta) para evaluar las interacciones entre los mejores tratamientos y los factores anteriormente mencionados.

#### **6.10.4. Pruebas de biodegradabilidad del plaguicida**

- Para la cuantificación de la biodegradabilidad se realizaron ensayos con la técnica de respirometría, basada en la medición del consumo de oxígeno por parte de microorganismos que trabajan sobre un sustrato orgánico, el cual es degradado y oxidado a CO<sub>2</sub>. Este método mide el consumo de oxígeno continuamente en el tiempo y es útil para: evaluar la biodegradabilidad de sustancias químicas específicas; tratabilidad de residuos orgánicos industriales; el efecto de cantidades conocidas de compuestos tóxicos en la reacción de consumo de oxígeno en una muestra de agua residual o de sustancias químicas orgánicas (Lasaridi y Stentiford, 1998).
- El respirometro, determina la cantidad de oxígeno consumido por unidad de tiempo y de volumen. El respirometro electrolítico, presenta ventajas frente a otros métodos de determinación de DBO<sub>5</sub>, como por ejemplo trabajar con mayores cantidades de muestra y realizar diluciones más pequeñas, además que el ensayo puede tener mayor duración, el equipo es de fácil manejo, así mismo puede medirse la DBO a distintos tiempos y permite determinar las constantes cinéticas

(Villaseca 2007). El ensayo de respirometría electrolítica está descrito a continuación:

### **Ensayo de respirometría electrolítica o biodegradabilidad.**

En este estudio se evaluó la biodegradabilidad del endosulfan como única fuente de carbono por *Pseudomonas putida* utilizando un respirometro electrolítico (Figura 19). El procedimiento se describe a continuación:

- Reactivación de las cepas en medio de cultivo con tween 80 con un periodo de incubación de 24 horas a 30 °C.
- Se realizó una suspensión bacteriana añadiendo colonias aisladas del microorganismo en el regulador de fosfato 50 mM a pH 7, alcanzando una concentración de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> equivalentes a 0.2 de absorbancia con una longitud de onda a 450 nm.
- Se prepararon 900 mL de medio de cultivo en el biorreactor que consistió en una fuente de carbono siendo el plaguicida (endosulfan) 1%, cloruro de potasio 0.2% y sulfato de magnesio 0.2%, después se agitó a 200 rpm hasta observar una disolución completa de las sales.
- Se ajustó a pH 7 el medio de cultivo del biorreactor y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos.
- Dejar enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente y se adiciona 100 mL de la suspensión bacteriana al biorreactor para alcanzar un volumen final de 1000 mL.
- Se coloca el biorreactor en la celda del respirometro electrolítico con una temperatura a 20 °C.
- Se programó el sistema del respirometro electrolítico para que la toma de muestra se realizara cada dos horas durante 8 y 15 días.
- El parámetro evaluado fue el consumo de oxígeno acumulado por *Pseudomonas putida*.



**Figura 19.** Ensayo de biodegradabilidad mediante respirometro electrolítico.

## **6.11. Postratamiento con *M. oleifera* del agua de un apantle de la zona chinampera**

### **6.11.1. Caracterización del agua de la chinampa**

#### **Muestreo**

- En concordancia con lo establecido por la NMX-AA-3-1980 Aguas residuales. La muestra se tomó con recipientes inertes al contenido de las aguas residuales (polietileno o vidrio) y se sellaron herméticamente.
- Los recipientes fueron lavados con detergentes libres de fosfatos y posteriormente enjuagados varias veces con agua del sitio antes de tomar la muestra. Se tomó una muestra compuesta (combinación de varias muestras simples).
- Finalmente, el recipiente fue etiquetado correctamente y almacenado a 4 °C. Se recomienda que el intervalo de tiempo entre la toma de muestra sea el menor posible y que no exceda de tres días.
- Se caracterizó el agua de la chinampa evaluando parámetros fisicoquímicos, microbiológicos, metales y plaguicidas organoclorados según la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud Ambiental, Agua para uso y consumo humano "Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".

En la Tabla 25, se muestran los parámetros de calidad del agua empleando los procedimientos normalizados (APHA 2005). Los métodos de análisis se resumen a continuación:

**Tabla 25.** Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos

Parámetros	Descripción del método de análisis
pH	<p>Es utilizado para determinar si una solución es ácida o básica, es la forma de medir la concentración de iones hidronio de una disolución. Se empleó un pHmetro marca y modelo Hach-One y la siguiente metodología:</p> <p>Se agregan aproximadamente 30 mL de muestra en un vaso de precipitado.</p> <p>Se introduce el electrodo del pH metro en la muestra</p> <p>Se realiza la lectura.</p>
DQO	<p>La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se usa para medir el equivalente a la materia orgánica oxidable químicamente mediante un agente químico oxidante fuerte, por lo general el dicromato de potasio, en un medio ácido y a alta temperatura, La determinación se realizó de la siguiente forma:</p> <p>Se preparan dos disoluciones.</p> <p>La primera solución se prepara pesando 6.6 g de <math>\text{Ag}_2\text{SO}_4</math> y se disuelven en un litro de <math>\text{H}_2\text{SO}_4</math>.</p> <p>La segunda solución se prepara mezclando 9 g de sulfato de mercurio en 300 mL de dicromato de potasio 0.25N. Posteriormente, se mezclan 2 mL de esta solución y 3 mL de la muestra.</p> <p>Sí al cuantificar la muestra la concentración excede de <math>400\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}</math>, se debe diluir la muestra.</p> <p>El testigo se realiza adicionando 2mL de la segunda solución a 3 mL de agua destilada.</p> <p>La lectura se realizó con un espectrofotómetro después de un período de digestión de 2 h en un digestor de tubo de Hach a <math>150\text{ }^\circ\text{C}</math>.</p>
Conductividad	<p>La conductividad eléctrica se utiliza para indicar la facilidad con que la corriente eléctrica pasa a través del agua. La medición</p>

	<p>del parámetro se realizó con el equipo GLP31 CRISON de la siguiente forma:</p> <p>Se coloca un volumen de muestra en un vaso de precipitado. Se introduce el conductímetro en el recipiente con la muestra y se mantiene hasta conseguir una medida constante. La medición se expresa en unidades de <math>\mu\text{S}/\text{cm}</math>.</p>
Sólidos disueltos totales	<p>La determinación de sólidos totales permite estimar la cantidad de materia disuelta y en suspensión que lleva una muestra de agua, se realiza de la siguiente forma:</p> <p>Se coloca una capsula de porcelana en un horno a temperatura de <math>105\text{ }^{\circ}\text{C}</math> durante dos horas.</p> <p>Se saca la capsula de porcelana del horno y se deja en un desecador durante dos horas.</p> <p>Se pesa la capsula de porcelana y se adiciona 100 mL de muestra.</p> <p>Se deja en baño maría hasta que se volatilice la muestra.</p> <p>Se lleva la capsula de porcelana al horno de <math>105\text{ }^{\circ}\text{C}</math> y se deja secar durante dos horas.</p> <p>Se saca la capsula del horno y se deja en un desecador durante dos horas.</p> <p>Se registra su peso final y se realiza la cuantificación por la diferencia de pesos.</p>
Sólidos Totales (ST)	<p>De acuerdo con la NMX-034-SCFI-2015 para el análisis de agua - medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas:</p> <p>Se introduce una cápsula de porcelana en horno a una temperatura de <math>105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}</math> por 20 min. Se traslada la cápsula al desecador y se dejó enfriar por 20 min. Posteriormente, se pesa la cápsula. Se repite este paso horno-desecador hasta obtener una diferencia <math>\leq 0.0005\text{ g}</math> en dos pesadas consecutivas.</p> <p>Se toman 20 mL de la muestra de agua y se ponen en una cápsula de porcelana previamente puesta a peso constante.</p> <p>Se procede al secado de la muestra sobre parilla de calentamiento evitando la ebullición de la misma, para evitar la proyección de la muestra.</p>

Posteriormente se termina de secar en horno a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 h, y se deja enfriar por 20 min en desecador. Se repite este paso horno-desecador hasta obtener una diferencia  $\leq 0.0005\text{ g}$  en dos pesadas consecutivas.

Para el cálculo de los Sólidos Totales se sigue la siguiente formula:

$$ST = \frac{(Cápsula\ evaporación [g]) - (Cápsula\ a\ peso\ cte. [g])}{Volumen\ de\ la\ muestra [mL]} * 1 \times 10^{-6} = \left[ \frac{mg}{L} \right]$$

De acuerdo con la NMX -034-SCFI-2015 para el análisis de agua - medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas:

Se introduce el crisol Gooch con el filtro de fibra de vidrio con poros de  $1.5\ \mu\text{m}$  en horno a una temperatura de  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Se traslada el crisol al desecador y se dejó enfriar por 20 min, posteriormente se pesa el crisol. Se repite este paso horno-desecador hasta obtener una diferencia  $\leq 0.0005\text{ g}$  en dos pesadas consecutivas.

Sólidos  
Suspendidos  
Totales (SST)

Se homogeniza la muestra de agua y con una probeta se vierte 20 mL de la muestra en el crisol Gooch montado sobre el equipo de filtración.

Posteriormente se introduce al horno a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 min y se transfiere al desecador. Se repite este paso horno-desecador hasta obtener una diferencia  $\leq 0.0005\text{ g}$  en dos pesadas consecutivas.

Para el cálculo de los Sólidos Suspendidos Totales se ocupa la siguiente formula:

$$SST = \frac{(Gooch\ evaporación [g]) - (Gooch\ peso\ cte. [g])}{Volumen\ de\ la\ muestra [mL]} * 1 \times 10^{-6} = \left[ \frac{mg}{L} \right]$$

### 6.11.2. Agua proveniente del biofiltro

El agua fue tomada del biofiltro previamente instalado en la Chinampa ubicada en latitud  $19^{\circ}, 16' 7.2''$  seg Norte., Longitud  $99^{\circ}, 5', 1.6''$  Este. Situada en el canal de Caltongo en la Zona Chinampera de Cuemanco de la CDMX (Rodríguez – Vázquez, 2018).



### **6.11.3. Funcionalización del material filtrante utilizando el extracto de las semillas de *M. oleifera***

#### **Preparación del extracto de las semillas de *M. oleifera***

Inicialmente se tamizaron las semillas para obtener 2 tamaños de partícula (0.86 mm y 2 mm), consecutivamente se pusieron en un horno a 100 °C durante 12 horas y 60 °C por 6 horas, a continuación, se agregó 5 gramos de las semillas tamizadas en una solución madre de 1L de agua destilada y 0.2 M de NaCl obteniendo una concentración de 5000 mg/L (5%).

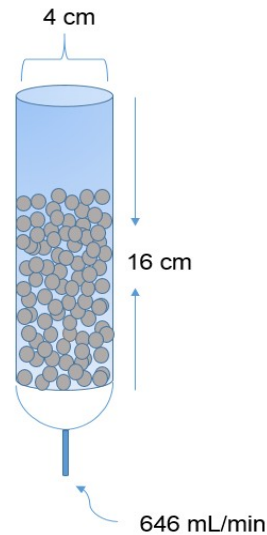
#### **Preparación del material filtrante**

Se utilizó la gravilla como material filtrante, se tamizó para obtener un tamaño de partícula de 4 mm, la mayoría de las partículas son redondeadas poseen gran dureza y resistencia a la degradación durante el uso, posteriormente, se realizaron 3 lavados de agua de grifo, 3 lavados con agua destilada y finalmente el material se dejó durante 24 horas con agua desionizada. Posteriormente, se retiró el agua y se dejó secar el material.

#### **Extracto de las semillas de *M. oleifera* con el material filtrante**

Con el material previamente seco, se dispuso la gravilla en un Erlenmeyer de un volumen de 250 mL donde se adicionó 110 mL del extracto de las semillas de *M. oleifera* con agitación de 150 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente (25 °C). Después de dejar funcionalizado el extracto de las semillas con el material se retiró la gravilla del extracto para extenderlo en papel aluminio y dejar secar durante 12 horas a temperatura ambiente (25 °C) (ver Figura 20).

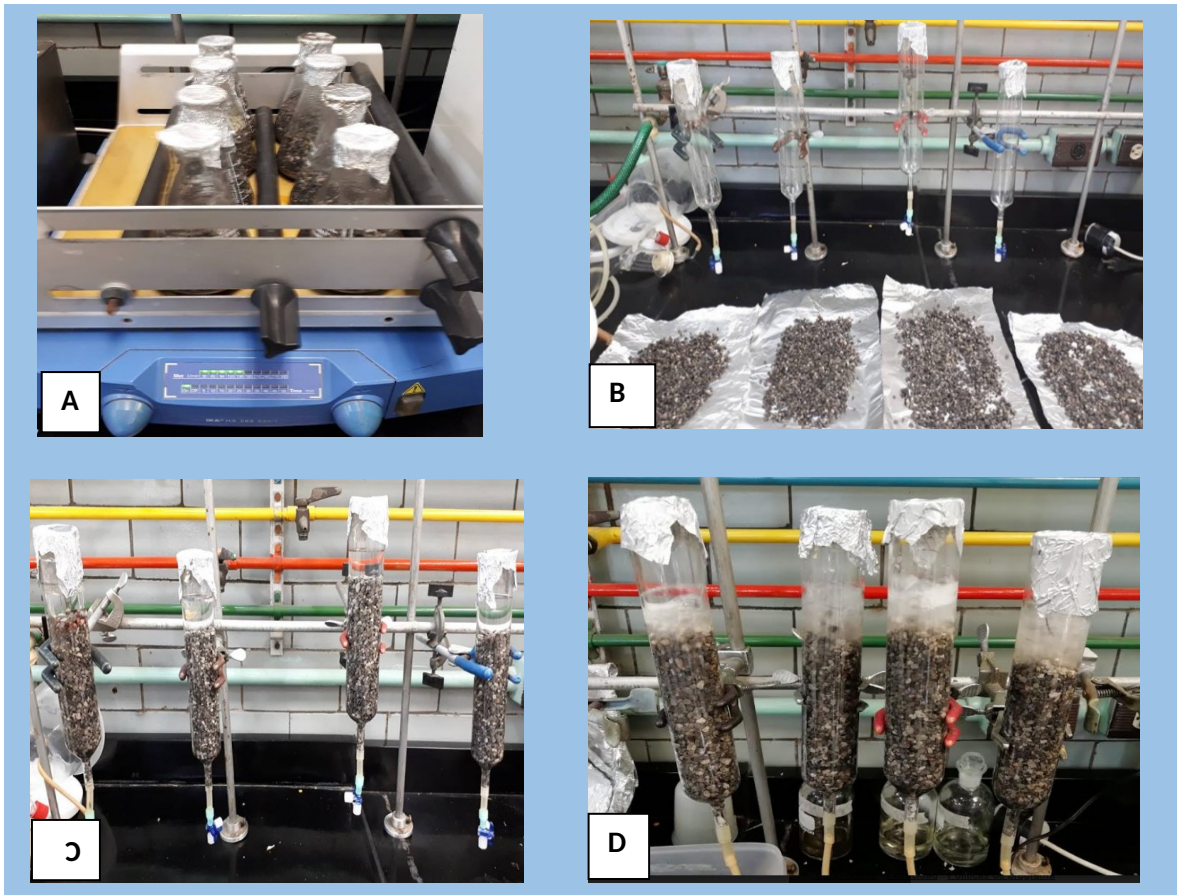
Una vez el material funcionalizado seco, se recolectó para ser puesto en columnas de vidrio con un volumen total de 188.5 cm<sup>3</sup> (diámetro = 4 cm) y (longitud de 16 cm) como se observa en la siguiente Figura:



**Figura 20.** Esquema del biofiltro percolador.

El cuerpo del filtro está constituido por un cilindro alargado de vidrio, en su extremo superior, dicho cilindro no tiene una tapa solo una abertura de forma circular con un conector hueco también cilíndrico en el centro, con el que se conecta un tubo por el cual llega el agua que será tratada en el filtro, en el extremo inferior saldrá el efluente del agua tratada que será recolectada en un recipiente, en aquellos experimentos donde se utilizarán aeración el flujo de aire en la columna es de 646 mL/min.

El agua a tratar simula las condiciones de la zona chinampera (pH 7, conductividad en un rango de 800 y 4000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y concentración celular de *E. coli* de  $5\text{-}9 \times 10^4$  UFC/mL). A continuación, en la siguiente figura 21, se observa el procedimiento para la funcionalización de *MoSe* en la gravilla.



**Figura 21.** Funcionalización de la gravilla con el extracto de las semillas de *M. oleifera* para la reducción de *E. coli*.

### Sistema del biofiltro

La instalación del biofiltro se ajustó después del tratamiento secundario (biofiltro secundario) ver figura, el diseño del biofiltro percolador se realizó de acuerdo a los estudios previos realizados por (Vegol et al. 2017) donde utilizó filtros de arena funcionalizados con *MoSe* para evitar la liberación de materia orgánica residual en el medio acuoso, así mismo, la funcionalización del material filtrante tendría algunos grupos funcionales activos de la semilla para la purificación del agua, sin embargo, en el presente estudio se realizaron algunos cambios y ajustes descritos a continuación:

#### 6.11.4. Diseño de Experimentos para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la semilla de *M. oleifera* funcionalizado en el material filtrante

Se realizó un diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  seleccionando los siguientes factores independientes: tiempo de secado, aireación, concentración del extracto de la semilla, salinidad, tiempo de retención hidráulico, tamaño de partícula, tiempo de lisis de *E. coli*. Los valores de los niveles alto y bajo de cada factor independiente se encuentran a continuación en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Factores independientes y sus valores bajo y alto del diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  para la reducción de *E. coli* en los biofiltros percoladores funcionalizados con el extracto de *M. oleifera*.

Factores independientes		Codificados		Naturales	
		Niveles			
		Alto	bajo	alto	bajo
Temp Secado (°C)	A	-1	1	60	100
Aireación	B	-1	1	0	1 hora
Concentración %	C	-1	1	3	5
Salinidad	D	-1	1	800	1500
Tiempo RH (h)	E	-1	1	6	12
Tamaño de partícula	F	-1	1	0.86	2
Tiempo de lisis	G	-1	1	2	3

Números sin codificar: Nivel alto (1) y Nivel bajo (-1).

A continuación, en la Tabla 27 se observa la matriz del diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  con un total de 8 tratamientos, las variables independientes que se evaluarán son: reducción de concentración celular de *E. coli*, tensión superficial y el índice de emulsificación.

**Tabla 27.** Matriz del diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  para la reducción de *E. coli* en los biofiltros percoladores funcionalizados con el extracto de *M. oleifera*.

Tratamientos	A	B	C	D	E	F	G
T1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
T2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
T3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
T4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
T5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
T6	1	-1	1	1	1	-1	-1
T7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
T8	1	1	1	1	1	1	1

#### 6.11.5. Instalación del sistema de purificación

Una vez estabilizado el biofiltro, se estableció el sistema de purificación del agua pretratada; para lo cual se contempló realizar la instalación de filtros conteniendo la semilla bajo las condiciones previamente establecidas (Tiempo de contacto, tiempo de reuso, concentración y tamaño de partícula de *M. oleifera*) y se realizó la evaluación de los parámetros de calidad del agua cada semana como lo indica la metodología de Chandrasena et al. (2017).

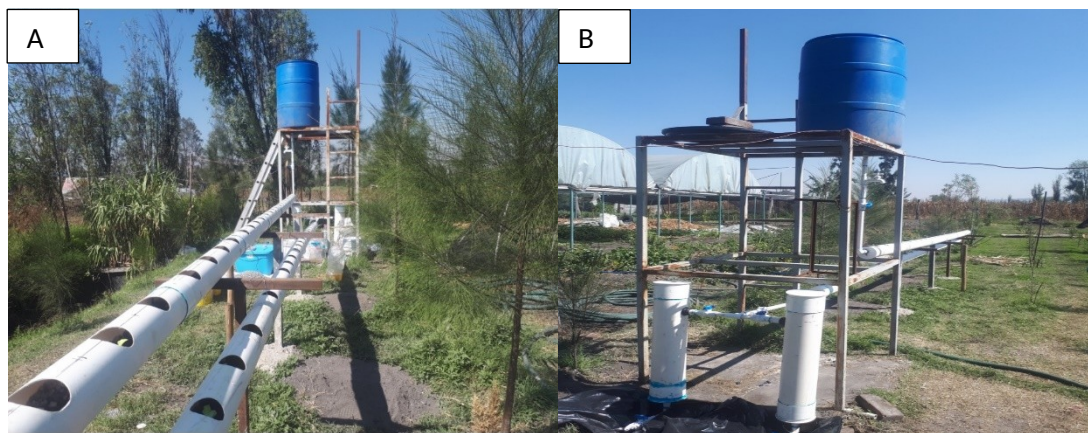
#### 6.11.6. Limpieza del Sistema Hidropónico

Antes de la construcción del sistema se dispuso a la limpieza del sitio y del biofiltro. Así mismo, antes de evaluar el funcionamiento del sistema, se realizó la limpieza con soluciones de ácido clorhídrico (HCl) (1%), Hidróxido de sodio (NaOH) (1%) etanol (1%) y agua. Finalmente se dejó secar y se dispuso de la puesta de los materiales de grava y corcho ya previamente tratados y lavados.

En la limpieza del biofiltro, inicialmente se retiraron materiales vegetales y plantas acuáticas como la lentejilla de agua (*Lemna minor*) que se encontraba en la superficie del agua.

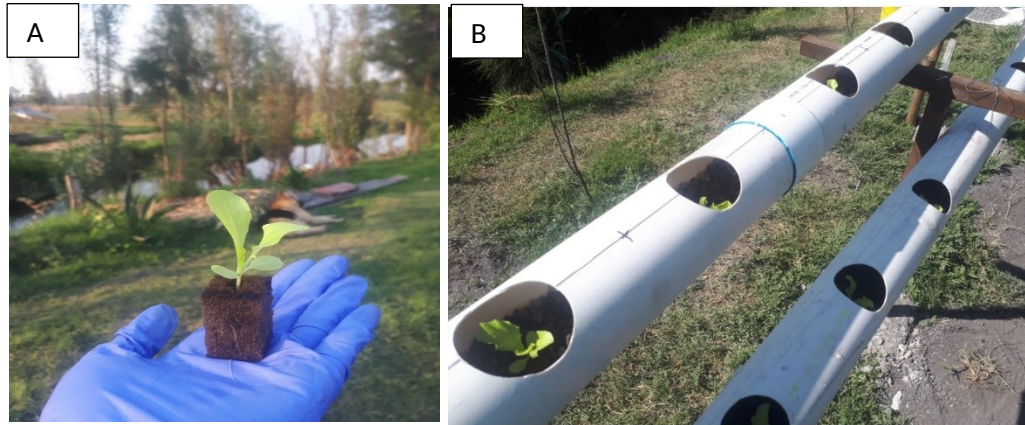
#### 6.11.7. Montaje inicial de la tecnología del sistema de hidroponía

El sistema hidropónico NFT seleccionado fue un sistema cerrado para evitar perturbaciones por condiciones ambientales como el sol, lluvia, vientos fuertes y frío que puedan perturbar su funcionamiento. El sistema comprende tres secciones, el primero un contenedor donde se dispone el agua tratada por un sistema de biofiltros, en ese contenedor se encuentra una primera filtración que aísla sólidos disueltos de gran tamaño, la segunda sección es un canal cubierto de material PVC presenta una pendiente del 1% con un sistema de filtración constituido de una sección de grava con dos tipos de tamaño de partícula (el menor tamaño fue proporcionado en el inicio del sistema y el mayor tamaño distribuido desde la mitad hasta el final), este sistema presenta una longitud de 12 metros en donde se cultivaron plantas de lechuga (*Latuca Sativa*) por ser aquellos cultivos de fácil y rápido crecimiento como se observa en la Figura 22.



**Figura 22.** Sistema de hidroponía NFT, sistema de filtración con grava (A); sistema de filtración de corcho funcionalizado con *M. oleifera* (B).

Adicionalmente, este sistema presenta una longitud de 12 metros donde se cultivaron plantas de lechuga (*Latucca Sativa*) por ser aquellos cultivos de fácil y rápido crecimiento como se observa en la Figura 23.



**Figura 23.** Plantas seleccionadas para el sistema de cultivo “*Latucca Sativa*”.

#### **6.11.8. Evaluación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del canal**

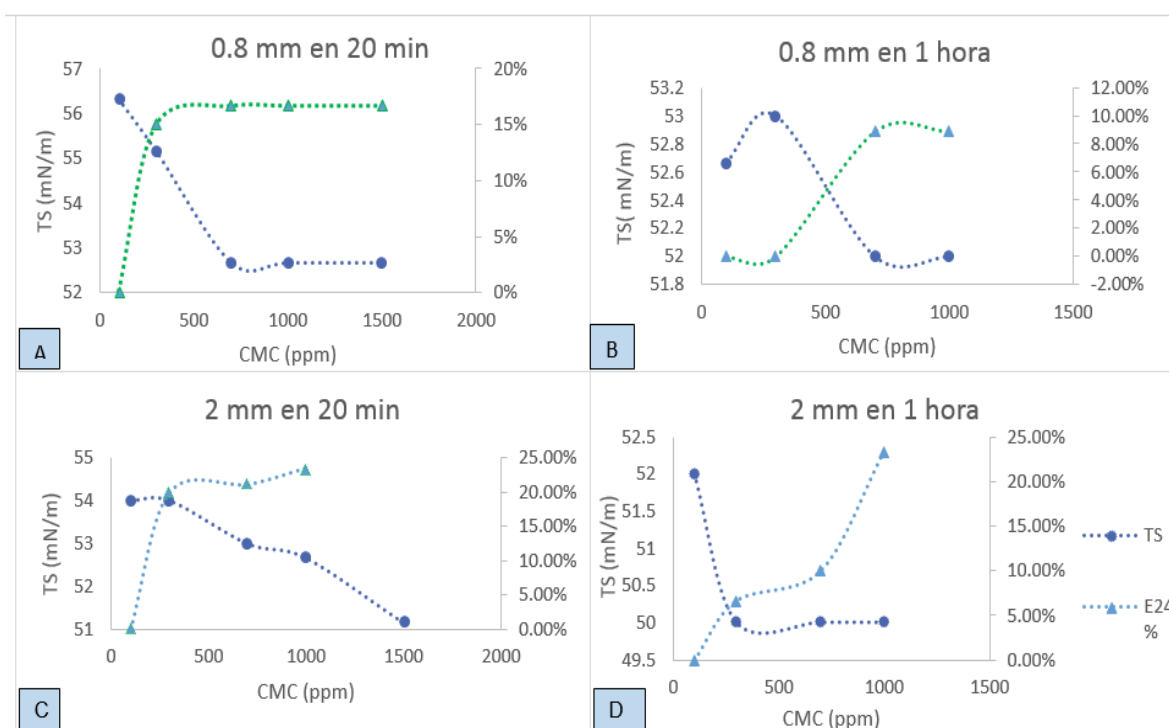
Antes de la recolección del agua en cada parte de los biofiltros se realizaron las mediciones de algunos parámetros fisicoquímicos del estado del agua in situ un equipo multiparamétrico HI9829 donde se midió: pH, oxígeno disuelto (OD), Conductividad eléctrica (CE), Sólidos disueltos totales (SDT). Adicionalmente, en los análisis microbiológicos se realizó la toma de muestra con envases estériles aptos para la cuantificación de *E. coli*.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Evaluación de las características surfactantes

#### 7.1.1. Concentración micelar crítica (CMC) para seleccionar la mejor dosis según la actividad emulsificante de *M. oleifera*

A continuación, en el presente estudio se evaluó el efecto de la concentración micelar crítica de *MoSe*, el tamaño de partícula y el tiempo de contacto sobre la tensión superficial y la capacidad de la actividad emulsificante como se observa en la Figura 24.



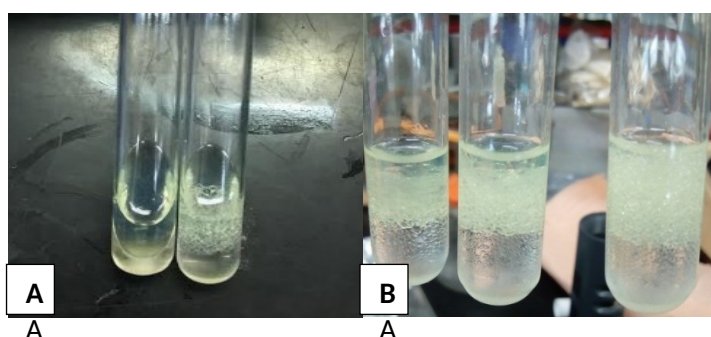
**Figura 24.** Efecto del extracto de las semillas de *M. oleifera* sobre la tensión superficial y la actividad del emulsificante con un (TP) tamaño de partícula de 0.86 mm por 20 min (A); 0.86 mm por 1 hora (B); (TP) de 2 mm por 20 min (C); (TP) 2 mm por 1 hora (D).

Inicialmente se utilizó el tamaño de partícula de 0.86 mm con un tiempo de 20 minutos de contacto entre la semilla y el agua destilada, los parámetros



relacionados directamente con el efecto de las propiedades tensoactivas de las semillas fueron la tensión superficial y la actividad emulsificante, evidenciando que a una CMC de 100 mg/L redujó la tensión superficial del agua con un valor inicial de 72 mN/m a 56 mN/m y un índice de emulsificación E<sub>24</sub> de 15%, este comportamiento entre los parámetros permaneció constante con una CMC de 300, 500, 700 y 1500 mg/L, mientras que al usar el mayor tiempo de contacto de 1 hora con el mismo tamaño de partícula (0.86 mm) y CMC 300 la tensión superficial continuó disminuyendo a un valor de 52 mN/m con una reducción total de tensión superficial de 20 mN/m sin realizar la extracción de aceite, mientras que el índice de emulsificación se observó que fue menos estable y su capacidad disminuyó a un valor E<sub>24</sub> de 8.8% con una CMC de 700 mg/L, este comportamiento del surfactante según lo indicado en los estudios de López (2017) puede deberse al incremento de la entropía que ocurre cuando la región hidrofóbica del surfactante es aislada del contacto con el agua y por tanto se produce una pérdida de la estructura ordenada de las moléculas del agua, así que conforme se aumenta la concentración la tensión superficial disminuye hasta mantenerse constante, al llegar a la mínima tensión el surfactante forma micelas espontáneamente y es en este punto donde se localiza la CMC, la CMC seleccionada para la realización del diseño factorial fraccionado se realizó a partir de estos resultados utilizando dos concentraciones una baja de 700 mg/L y alta de 1500 mg/L.

Adicionalmente, se observó el efecto del tamaño de partícula sobre la CMC y la actividad emulsificante del extracto de las semillas de *M. oleifera* utilizando las siguientes condiciones: TP 2 mm durante un tiempo de 20 y 60 minutos, la estabilidad del biosurfactante fue de 24 y 120 horas con diésel arrojando un valor E<sub>24</sub> de 23.33% (Figura 25).



**Figura 25.** Estabilidad de la actividad emulsificante del extracto de semillas de *M. oleifera* después de 24 horas (A) tamaño de partícula de 0.86 mm y (B) tamaño de partícula de 2 mm.

Según los estudios de Ndabigengesere et al. (1995), indica que las principales características de las macromoléculas como las proteínas con actividad coagulante presentes en las semillas de Moringa, están conformadas por ingredientes activos diméricos con un peso molecular de aproximadamente 1300 Da y un punto isoeléctrico entre 10 y 11 esta característica del bajo peso molecular puede asociarse al estudio realizado por (McClements y Weiss 2005), explicando que las moléculas de bajo peso molecular pueden formar emulsiones y poseer actividad superficial y que por ello, tienden a adsorberse en la superficie de las gotas formando una barrera protectora que previene la agregación entre ellas. Los emulsionantes que se usan generalmente son proteínas anfifílicas, polisacáridos, tensioactivos de bajo peso molecular y fosfolípidos. Los polisacáridos promueven la formación de una red de gotas de aceite (Dickinson 2009). Además, algunos polisacáridos poseen actividad superficial y por tanto actúan como excelentes emulsificantes (Dickinson 2006).

Así mismo a continuación en la Tabla 28 se observa las concentraciones seleccionadas a partir de la CMC menor (700 mg/L) y mayor (1500 mg/L) con TP (0.86 y 2 mm) y tiempo de contacto de (20 y 60 minutos), la selección se realizó de acuerdo a la estabilidad de la actividad emulsificante, parte de este comportamiento biosurfactante puede ser explicada por el estudio de Clark (2004) donde indicó que los biopolímeros presentan alta efectividad en la estabilidad de las emulsiones tales como proteínas y polisacáridos. Por lo tanto, los floculantes orgánicos como *M. oleifera*, taninos y cactus incluyen polielectrolitos catiónicos y aniónicos, no aniónicos además de ser polímeros clarificantes de agua, por lo que los estudios de Aranberri et al. (2006) puede soportar parte de la explicación

utilizando un biopolímero en las emulsiones aceite/agua, generalmente, la adición de polímeros hidrosoluble provoca un aumento de la viscosidad de la fase continua lo que genera una disminución de la movilidad de las gotas, descendiendo así, la probabilidad de que dos gotas se encuentren y se agreguen. En cambio, si la concentración de polímero es muy pequeña, el efecto es el inverso debido a la floculación por depleción. Las macromoléculas como las proteínas pueden tener gran actividad superficial.

**Tabla 28.** Evaluación de las características de la tensión superficial y la capacidad emulsificante del extracto de las semillas de *M. oleifera*

	Desecador 0.8 mm a 20 min		Desecador 0.8 mm 60 min		Desecador 2 mm a 20 min		Desecador 2 mm a 60 min	
CMC (mg/L)	700	1500	700	1000	700	1500	700	1000
$\Delta$ TS (mN/m)	16.7	20	21	21	19	19	22	22
(E <sub>24</sub> ) (%)	19	16.67	8.89	8.89	21.11	23.33	10	23.33

#### 7.1.2. Efecto del extracto de las semillas de *Moringa oleifera* sobre la tensión superficial, actividad emulsificante, conductividad, pH y oxígeno disuelto

A partir del análisis estadístico ANOVA, se determinó el nivel de significancia para cada variable evaluada, inicialmente se observó la tensión superficial con un valor de  $p < 0.0001$  indicando que hay diferencia significativa y  $R^2 = 0.96$  donde el diseño factorial fraccionado  $2^{6-3}$  se ajustó a las variables de respuesta, posteriormente al realizar el análisis de medias con la prueba LSD Fisher (least significant difference) entre los tratamientos se obtuvo 5 grupos de los cuales no hay diferencia entre (6,5,3), (5,3,7 y 4), y (3,7,4 y 8) siendo diferente de 2 y 1. En cuanto al análisis de regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación  $TS = 26.27 -$

$2.77TP - 1.94CMC - 0.58TC + 1.72pH$  donde las variables con alta significancia fueron: Menor tamaño de partícula (0.86mm), menor CMC (700 mg/L), menor tiempo de contacto (20 min) y mayor pH (8.5). Los resultados de los demás tratamientos del ANOVA se podrán observar en el Anexo 1.

Consecutivamente en el análisis de la actividad emulsificante, los datos procesados fueron aquellos donde la estabilidad de la emulsión fue mayor a 24 horas, observando un valor de  $p=0.05$  y un  $R^2 = 0.60$ . En cuanto al análisis de regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación  $AE = 31.39 + 3.61CMC - 3.61CD + 3.61pH$  donde las variables con alta significancia fueron: mayor CMC (1500 mg/L), menor conductividad (1500  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), mayor pH (8.5). Según el estudio de Kosegarten y Jimenez (2012) indicó que el buen rendimiento de una emulsión se genera si este es del 95% inmediatamente de la agitación, y si es del 70 y 80% después de algunas semanas de almacenamiento inactivo, en lo cual las moléculas de proteína que se adsorben más tarde tienden a retener mayor su actividad y pueden participar también en multicapas menos retenidas. Por ejemplo, se han utilizado biopolímeros que actúen como emulgentes y tienen la capacidad no solo de presentar una alta actividad superficial sino también propiedades de solvatación, indicando que la naturaleza y la interacción entre estas moléculas contribuyen a la estabilidad, este complejo o interacciones pueden ser débiles o fuertes dependiendo de las condiciones de la solución como el pH, la temperatura, fuerza iónica entre otras (Kruif y Tuiner, 2001). Adicionalmente el balance hidrófilo-lipófilo (BHL) es un método semiempírico utilizado para clasificar los emulgentes no iónicos. El valor de BHL es un indicador de su grado de solubilidad en la fase acuosa o en la fase oleosa, y puede ser usado dependiendo del tipo de emulsión que será formada. Cada emulgente tiene asignado un valor de BHL de acuerdo con su estructura química. En la escala utilizada los valores para este término van de 0.5 a 19.5, el punto medio del balance es 10, de ahí hacia abajo son cada vez más lipófilos y del 10 hacia el 19.5 van creciendo en hidrofiliidad.

A continuación, en la Tabla 29, se observan los valores obtenidos para cada tratamiento de *MoSe* sobre la tensión superficial, actividad emulsificante, conductividad, oxígeno disuelto y pH.

**Tabla 29.** Efecto del extracto de las semillas de *Moringa oleifera* sobre las variables de respuesta del diseño factorial fraccionado  $2^{6-3}$

Tratamientos	Tensión $\Delta TS$ (mN/m)	$E_{24}$ (%)	Conductividad ( $\mu S/cm$ )	OD (%)	pH
1	31.78	.	3,654	67.8	6.0
2	33.67	.	1,816	64.2	6.6
3	24.00	24.44	3,763	93.1	6.6
4	23.44	31.11	1,625	88.8	6.89
5	24.89	.	1,388	83.2	5.0
6	25.89	.	2,815	77	5.8
7	23.89	38.89	1,335	105.93	6.3
8	22.67	31.11	3,014	102.06	6.9

En cuanto a la conductividad se obtuvo un valor de  $p < 0.0001$  y un  $R^2 = 0.98$ , posteriormente utilizando la prueba LSD se observó diferencias entre las medias donde se formaron 4 grupos: (3 y 1), (8 y 6), (2 y 4) y (5 y 7). Posteriormente la ecuación del análisis de regresión lineal fue:  $CD: 2.42 - 0.28CMC + 0.88CD$  donde las variables con alta significancia fueron: menor CMC (700 mg/L) y mayor conductividad (4,000  $\mu s/cm$ )

Con respecto al pH se obtuvo un valor de  $p < 0.0001$  y un  $R^2 = 0.93$ , adicionalmente al realizar la prueba LSD se observó diferencias entre las medias donde se

formaron 5 grupos: (8, 4 y 2), (4, 2 y 3), (2, 3 y 7), (1 y 6) y (5). Posteriormente la ecuación del análisis de regresión lineal fue:  $\text{pH} = 6.30 + 0.42\text{TP} - 0.25\text{CMC} + 0.21\text{pH}$  donde las variables con alta significancia fueron: mayor tamaño de partícula (2 mm), menor CMC (700mg/L), y mayor pH (8.5).

## **7.2. Caracterización morfológica de una cepa presuntiva de *E. coli* aislada de un canal de Xochimilco**

A partir de una muestra de agua se aisló una cepa presuntiva de *E. coli* en un medio selectivo y diferencial EMB (eosina azul de metileno) característico para bacterias Gram negativas fermentadoras de lactosa, a continuación, en la Tabla 30 se observa las características macroscópicas y microscopias de la cepa.

**Tabla 30.** Características macroscópicas y microscópicas de *E. coli*

Cepas de <i>E. coli</i>	Características macroscópicas	Características microscópicas
	<p>Morfología macroscópica de las colonias de <i>E. coli</i> en agar E.M.B. (eosina y azul de metileno):</p> <p><b>Color:</b> colonias verde-metálico al observarlas bajo la luz.</p> <p>❖ <b>Forma y borde:</b> colonias circulares puntiformes con bordes continuos.</p>	<p>Morfología microscópica de <i>E. coli</i> al observarla en un microscopio con objetivo de 100x.</p>
	<p>❖ <b>Tamaño:</b> colonias medianas.</p> <p>❖ <b>Superficie y textura:</b> colonias convexas, lisas y brillantes.</p> <p>Morfología macroscópica de las colonias de <i>E. Coli</i> en agar nutritivo:</p> <p><b>Color:</b> colonias ligeramente blanquecinas.</p> <p><b>Forma y borde:</b> colonias circulares con bordes continuos.</p> <p>❖ <b>Tamaño:</b> colonias medianas.</p>	
		<p>❖ <b>Técnica utilizada:</b> tinción de Gram.</p> <p><b>Observación:</b> bacilos libres Gram negativos, sin producción de esporas. Según literatura tienen un tamaño de 0.5 <math>\mu</math> de ancho por 0.3 <math>\mu</math> de largo.</p>
	<p>❖ <b>Superficie y textura:</b> colonias planoconvexas, lisas</p>	

---

---

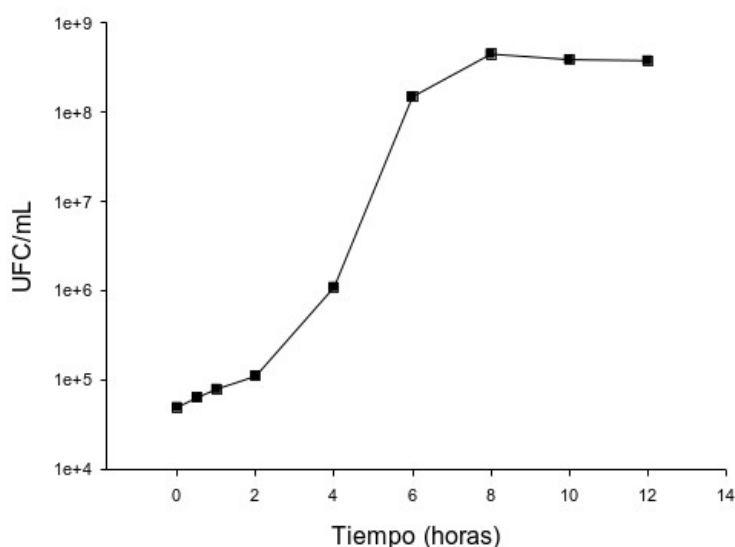
y brillantes.

---

Las colonias bacterianas presuntivas de *E. coli* aisladas de las muestras del canal de Xochimilco presentó una coloración verde metálico con una forma circular puntiforme característica de coliformes fecales, a continuación, se realizó un repique en agar nutritivo donde se obtuvo colonas blanquecinas circulares medianas, en cuanto a su característica microscópica se observaron bacilos Gram negativos.

### 7.2.1. Cinética de crecimiento de *E. coli* aislada de un canal de Xochimilco

A continuación, en la Figura 26 se aprecia la curva de crecimiento de *E. coli* durante un tiempo de 6 horas en caldo nutritivo, pH 7 a una temperatura de 37°C donde la fase de crecimiento celular inició a las 2 horas con una concentración de  $1.1 \times 10^8$  UFC/mL y la fase exponencial máxima se observó a las 3 horas con una concentración de  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL.



**Figura 26.** Cinética de crecimiento de *E. coli*.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Sutherland et al. (1995) donde incubó el microorganismo a 37 °C en caldo de soja triptona con pH 7.3 obteniendo



tiempos de generación aproximadamente entre 0.3 y 0.4 h mientras que en el estudio de Dos Santos (2007), Incubaron las bacterias en caldo BHI a 38 °C y pH 7.4 obteniendo tiempos de generación celular entre 0.2 y 0.4 horas, indicando que fueron las mejores condiciones para obtener el crecimiento más rápido monitorizado. Por tal razón, concluyeron que la cepa de *E. coli* presentó una reducción en el tiempo de latencia e incrementó la producción de ácido del medio inhibiendo la concentración microbiana siendo el pH el factor que más influyó en el comportamiento cinético de los microorganismos.

### 7.2.2. Análisis molecular de *E. coli*

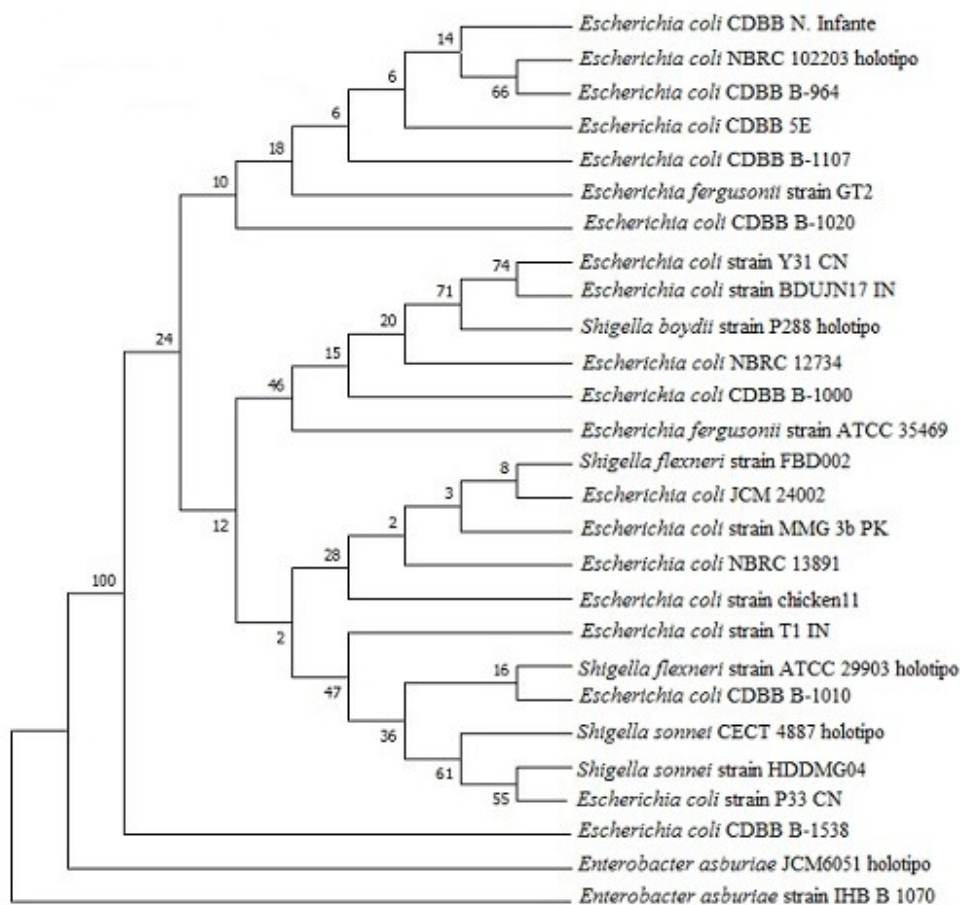
Se obtuvo un total de 1459 nucleótidos a partir de la secuencia del fragmento ribosomal 16S de la cepa presuntiva de *E. coli* como se observa en la siguiente Figura 27.

```
GAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCT
GACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGAAAA
CGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGA
TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGT
CTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTTGACGTTACCCGC
AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
TGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGCCCCCTGGACGAAGACTGACGC
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT
CGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGTTAAGTCGACCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAG
AATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAA
GGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACC
```

AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTC  
ATAAAGTGCGTAGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAA  
TCGTGGATCAGAAATGCCACGGTGAATACGTTCCGGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG  
GAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATG  
ACTGGGG

**Figura 27.** Secuencia más similar de acuerdo a la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con su base de datos de secuencias del fragmento 16S ribosomal de cepas tipo.

El análisis molecular de la secuencia del fragmento 16S ribosomal de la cepa enviada 1, se determinó la especie *Escherichia coli* con un 99% de similitud con la secuencia (Figura 28). *Escherichia coli* cepa NBRC 102203 (No. de acceso: NR\_114042.1). Cobertura de la secuencia 100%, Identidad 99%.



**Figura 28.** Dendograma de similitud de las secuencias analizadas (ubicada en color rojo) comparada con otras resultantes de la búsqueda BLAST, elaborado con MEGA 6.0 a través del método de Neighbor Joining (modelo T3P).

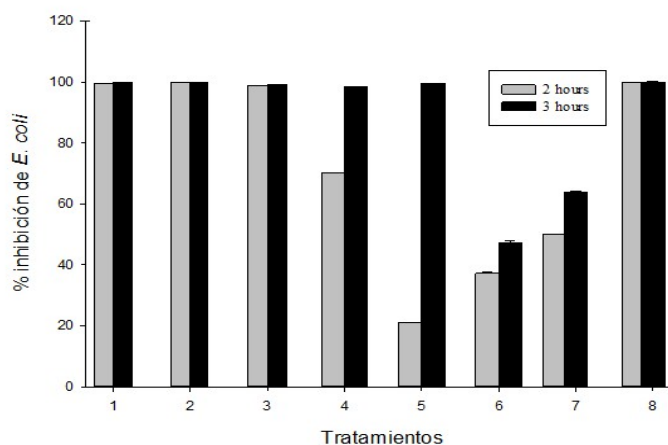
### 7.2.3. Selección de las condiciones experimentales para la inhibición de *E. coli*

En el presente estudio se realizó el análisis de varianza ANOVA y el método de regresión lineal general mínimos cuadrados para las variables de respuesta donde se obtuvo un valor de  $p < 0.0001$ , inicialmente se seleccionaron 2 tiempos de lisis de *E. coli* el tiempo menor fue 2 horas y el mayor 3 horas (Figura 29). El análisis con el menor tiempo (2 horas) obtuvo un  $r^2 = 0.80$  y un nivel de significancia ( $p < 0.0001$ ), las variables dependientes que presentaron alto nivel de significancia fueron CMC, salinidad y pH. Posteriormente se realizó el análisis de regresión con un  $r^2 = 0.67$  y un valor de  $p < 0.001$  arrojando la siguiente ecuación:  $\text{Inh} (\%) = 88.53 - 10.82 \text{ cmc} + 10.94 \text{ Tc}$  donde las variables con alta significancia fueron: Nivel bajo de CMC (700 g/mL del extracto) y nivel alto de Tc (60 min de tiempo de contacto) para 2 horas de tiempo de lisis de *E. coli*. Al comparar estos resultados con los estudios realizados por (García *et al.*, 2015) donde evaluó la actividad antibiótica de las semillas de *M. oleifera* asociado a la presencia de *Pterigospermina*, sometiendo concentraciones del extracto de la semilla de 400, 600 y 800 mg/L, las condiciones de la solución tenían valores cercanos a pH 7 indicando la actividad de iones de hidrógeno y posteriormente la acción del coagulante de Moringa debido a la presencia de proteínas catiónicas en las semillas.

En el estudio realizado por Kebreab *et al.* (2005) sobre la purificación de la proteína coagulante de las semillas de *M. oleifera* observó que no había diferencia en la actividad de la coagulación antes y después de extraer el aceite, por otro lado en sus estudios de actividad antimicrobiana reportó que el extracto donde se encontraba la proteína coagulante de *M. oleifera* en un tiempo de 2 horas logró conglomerar agregados de células de *E. coli* (D31) y la reducción hasta 4 unidades logarítmicas de *E. coli* (k12) resultados similares al del presente estudio.

En cuanto a la salinidad, la proteína coagulante de Moringa se puede extraer con agua o solución de sal (comúnmente NaCl). La cantidad y efectividad de la proteína coagulante a partir de sal y los métodos de extracción de agua varían significativamente. El extracto crudo con sal muestra un mejor rendimiento de la coagulación que el extracto de agua correspondiente, estos resultados por (Okuda et al. 1999) son consistentes con el presente estudio donde uno de los factores que tuvo efecto en la inhibición de *E. coli* fue la salinidad, esto puede explicarse por la presencia de una mayor cantidad de proteína soluble debido al fenómeno de salting-in (Farooq et al. 2007).

En cuanto a la presencia de coliformes fecales, en el estudio de Garcia et al. 2015 al usar únicamente semillas de Moringa redujó la presencia de los microorganismos aeróbicos y coliformes, cuando se comparó con el recuento de la muestra control (263 UFC/g), notándose una alta variación entre cada sistema evaluado: 112 UFC/g (400 mg/L), 93.3 ufc/g (600 mg/L), 98.7 UFC/g (800 mg/L), resultados similares a los del presente estudio (700 y 1500 mg/L). Finalmente, estas condiciones alcanzaron los parámetros permisibles para utilizar el agua para consumo animal y para riego en los cultivos. Garcia et al. (2015) asoció la presencia de la *Pterigoespermina* como un compuesto similar al *4-ramnosil bencilisotiocianato* siendo el producto de la condensación de dos moléculas de *bencilisotiocianato* con una molécula de *benzoquinona* considerada con potente actividad antimicrobiana Garcia et al. (2015).



**Figura 29.** Efecto de los extractos de las semillas de *M. oleifera* sobre el porcentaje de inhibición de *E. coli* en un tiempo de 2 y 3 horas.

El estudio indicó que las semillas de *M. oleifera* contienen diferentes agentes antibacterianos que se había separado con éxito mediante cromatografía en la columna de quitina. WSMoL fue activo en bacterias Gram-negativas (*E. coli*) y Gram positivas (*S. aureus*), mientras que el NHC solo fue activo en *S. aureus*. El crecimiento de *E. coli* en el sedimento de la suspensión bacteriana tratada con WSMoL sugiere que la lectina puede promover la coagulación bacteriana, aunque no podría inactivar las bacterias (Coriolano et al. 2019).

En el estudio realizado por Shebek et al. (2015) evaluaron el mecanismo molecular de la interacción de una proteína catiónica extraída de las semillas de Moringa con las membranas celulares bacterianas en el contexto de su uso propuesto como agente antimicrobiano y uno de los posibles mecanismos que puede inducir la inhibición de *E. coli*, que la proteína catiónica de *M. oleifera* (MOCP, también conocida como Flo) contribuye fuertemente a la capacidad del polvo de la semilla para inhibir el crecimiento celular y eliminar las partículas negativas de la solución.

El modelo de mínima diferencia significativa (LSD) se utilizó para realizar las comparaciones entre las medias de los tratamientos donde se observó que no hay diferencia significativa entre los tratamientos 8, 2,1 y 3, siendo diferentes de 7,6,5 y 4. El mejor tratamiento dado para la actividad antimicrobiana fue el 8 con (TP 2 mm, CMC 1500 mg/L, TC 60 min, CD 4000  $\mu$ s/cm y pH 8.5).

Con respecto a las proteínas totales, se obtuvo un  $r^2= 0.73$  con la siguiente ecuación arrojada por el análisis de regresión  $Prot = 18.68 -5.22Tl+5.03Tp -5.74 pH$  donde las variables con alta significancia fueron: nivel bajo de tiempo de lisis (2

horas), nivel alto de tamaño de partícula (2 mm) y nivel bajo de pH (valor de pH 7). Según el modelo LSD para comparar la media entre los tratamientos se evidenció que El único tratamiento que presenta el mayor valor de proteína es el 3, siendo diferente de los 3 grupos de tratamientos.

En el tiempo mayor de 3 horas, el análisis de varianza ANOVA y el método de regresión lineal general mínimos cuadrados obtuvo un valor de  $p < 0.001$  con un  $r^2 = 0.67$ . Las variables dependientes que presentaron alto nivel de significancia fueron CMC y Tc (tiempo de contacto). El modelo de regresión arrojó la siguiente ecuación  $\text{Inh (\%)} = 88.53 - 10.82 \text{ CMC} + 10.94 \text{ Tc}$ . Las variables con alta significancia en la inhibición fueron nivel bajo de CMC (700 mg/L del extracto) y nivel alto de Tc (60 min de tiempo de contacto) para 3 horas de tiempo de lisis de *E. coli*.

A partir de realizar el análisis de medias mediante la prueba LSD se observó que, entre los 2 grupos obtenidos, no hay diferencia significativa entre los tratamientos 8, 2, 1, 5 y 3, siendo diferentes de 4, 7 y 6. En cuanto a las proteínas totales, se obtuvo un  $r^2 = 0.73$  con la siguiente ecuación arrojada por el análisis de regresión  $\text{Prot} = 18.68 - 5.22\text{TI} + 5.03\text{Tp} - 5.74 \text{ pH}$  donde las variables con alta significancia fueron: nivel bajo de tiempo de 2 horas, nivel alto de tamaño de partícula 2 mm y nivel bajo de pH 7.

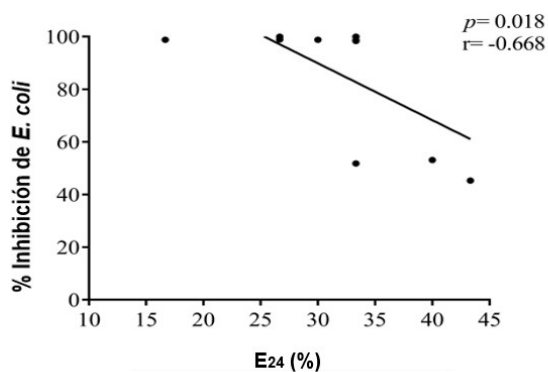
#### **7.2.4. Correlación entre la Tensión superficial, emulsificación y la inhibición de *E. coli***

Se realizó la correlación estadística para determinar la relación entre las variables dependientes como: la tensión superficial, índice de emulsificación y la inhibición de *E. coli*. Se utilizó MoSe en dos tiempos de lisis hora 2 y 3, respectivamente. Inicialmente el ANOVA otorgado por el procedimiento lineal generalizado (GLM) realizado en el programa de SAS versión 8.1, arrojó un valor de nivel de

significancia ( $<0.0001$ ) y un  $R^2 = 0.77$  presentando una correlación moderada del modelo. En cuanto a la variable dependiente como la inhibición de *E. coli* aquellos factores independientes que presentaron un efecto significativo fueron: el tiempo inicial, la concentración micelar crítica, la conductividad y el pH ( $<0.05$ ).

En cuanto a la tensión superficial el ANOVA que se obtuvo del modelo fue de  $p = <0.0001$  y un  $R^2 = 0.82$  presentando una correlación moderada. Las variables independientes que presentaron un alto nivel de significancia sobre la tensión superficial fueron: el tiempo inicial, la concentración micelar crítica (CMC) y el pH  $p = <0.0001$ ). Al ajustar el modelo de regresión lineal con un valor de significancia de 0.0026 y  $R^2 = 0.65$ . Se obtuvo una ecuación  $TS = 48.41 - 1.50$  donde los factores independientes significativos fue el pH (nivel bajo).

En el índice de emulsificación el ANOVA el modelo (GLM) fue de  $p = 0.018$  y un  $R^2 = 0.668$  presentando una correlación moderada baja. El tiempo de inicial, el tamaño de partícula, la CMC, el tiempo de contacto y la conductividad presentaron alto nivel de significancia ( $p = <0.05$ ). A continuación, en la Figura 30 se encuentra el índice de emulsificación para aquellos tratamientos que presentaron estabilidad en las emulsiones después de 24 horas con diésel, células de *E. coli* y las semillas del extracto de *M. oleifera*.



**Figura 30.** Correlación del índice de emulsificación y la reducción de *E. coli*.

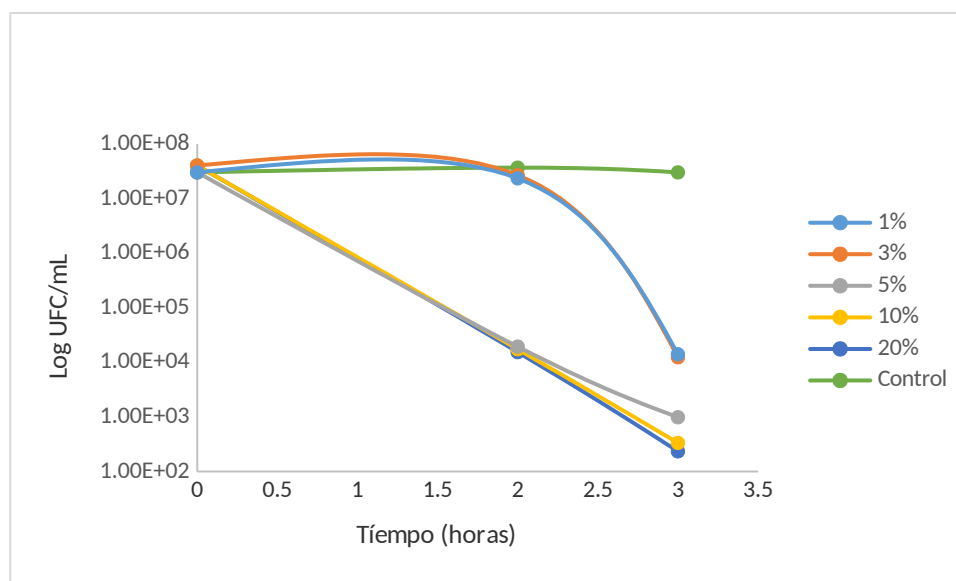
Así mismo, se determinó la correlación de los tiempos de lisis celular sobre la inhibición de *E. coli*, la tensión superficial y el índice de emulsificación. El procedimiento lineal generalizado (GLM) obtuvo un ANOVA con un valor de ( $p < 0.0001$ ) para el tiempo de inhibición de 2 horas y un  $R^2 = 0.80$  presentando una correlación positiva moderada donde los factores independientes que presentaron un efecto significativo fueron: Concentración micelar crítica (CMC), conductividad y pH. Cuando se ajustó al modelo de regresión lineal se obtuvo un nivel de significancia de ( $< 0.0001$ ) y  $R^2 = 0.80$  donde la inh =  $63.32 - 11.24 + 4.37 + 8.12 - 0.62$  presentando las siguientes variables independientes con alta significancia como: la concentración micelar crítica (nivel bajo), pH (nivel alto) y conductividad (nivel alto).

#### **7.2.5. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar el efecto inhibitorio de las semillas sin extraer el aceite sobre *E. coli***

Inicialmente se seleccionaron las concentraciones *MoSe* que presentaron una mayor influencia en la reducción de la bacteria, donde se obtuvo que a concentraciones por encima o igual de 20% las concentraciones de *E. coli* redujeron hasta  $10^2$  UFC/mL.

Se evaluó el crecimiento de *E. coli* durante 3 h y se expusieron a diferentes concentraciones del aceite de *Moringa oleifera*; en la Figura 31, se evidencia a partir de la concentración del 20% se evidencia una disminución significativa de la bacteria.

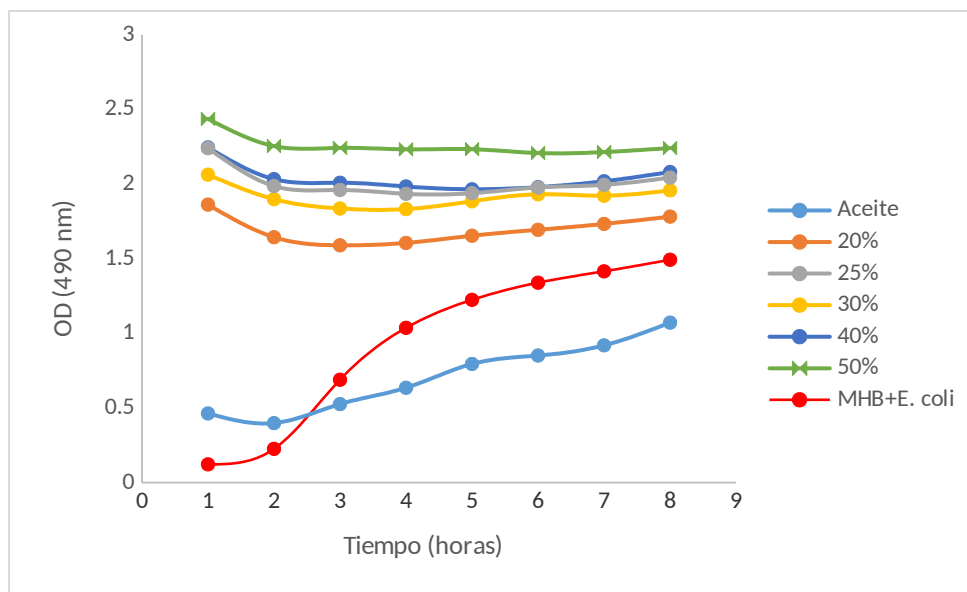




**Figura 31.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de *M. oleifera* a diferentes concentraciones sobre *E. coli* utilizando con la prueba de microgota para observar viabilidad en placa.

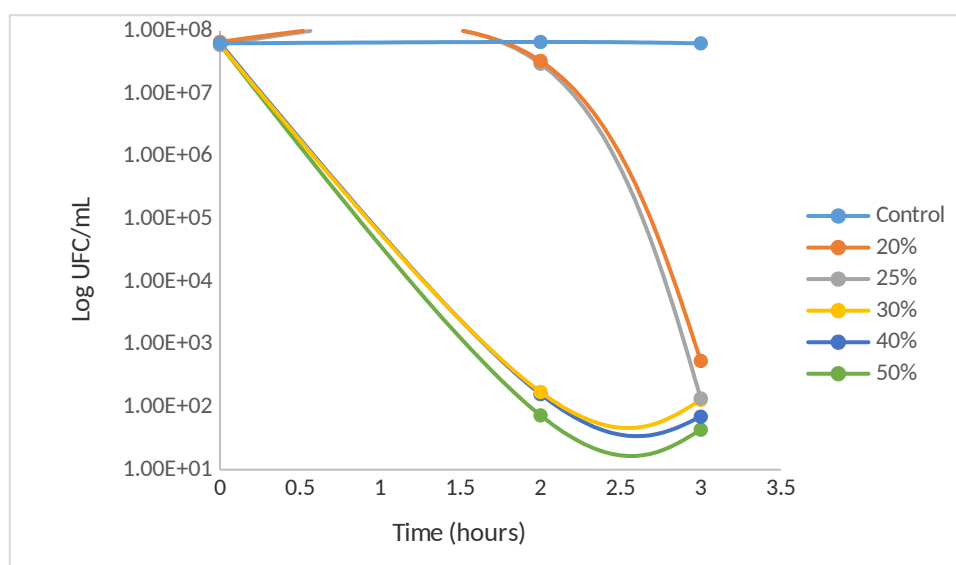
Adicionalmente, se desarrolló el experimento de la concentración mínima unhibitoria con la prueba TECAN (Figura 32), donde se evaluaron concentraciones entre el 20 y el 50% del extracto de *M. oleifera* con aceite; la medición se realizó por turbimetría (OD).

Al realizar los análisis, se observó que hay diferencia altamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre los tratamientos donde utilizaron las concentraciones del extracto de la semilla de 20 a 50% en comparación con el aceite. Sin embargo, entre las concentraciones del 20 al 50% del extracto de la semilla, no se observan diferencias significativas; lo cual podría indicar que al aumentar la concentración puede haber una saturación del sistema y los microorganismos pueden estar utilizando algún componente del extracto de las semillas como fuente nutricional. Está hipótesis es soportada por el comportamiento a través del tiempo; ya que a partir de la hora 5 se puede observar un aumento en la concentración de *E. coli* en los tratamientos.



**Figura 32.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de *M. oleifera* a diferentes concentraciones sobre *E. coli* con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.

Paralelamente mientras la prueba de turbidimetría se estaba llevando a cabo se realizaba la determinación del efecto de las semillas con aceite sobre la bacteria cultivándola en el medio selectivo para determinar viabilidad y confirmando la influencia de la concentración sobre la inhibición de *E. coli*. Así mismo, se observó la máxima actividad antimicrobiana a partir de la concentración del extracto de las semillas del 30%; evidenciándose la disminución de 6 unidades logarítmicas de *E. coli* después de dos horas de tratamiento (Figura 33). Cabe destacar que en las concentraciones de extracto de 20 y 25% también se presentó la misma inhibición del microorganismo, pero después de tres horas de tratamiento.

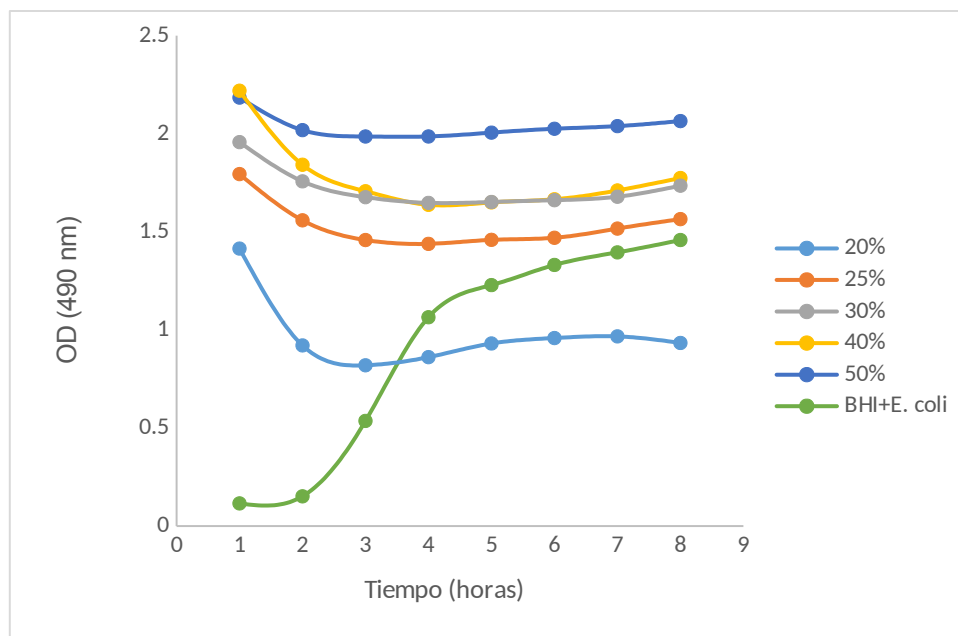


**Figura 33.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de *M. oleifera* a diferentes concentraciones sobre *E. coli* mediante la prueba de microgota para observar viabilidad en placa.

#### **7.2.6. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar el efecto inhibitorio de las semillas con la extracción del aceite sobre *E. coli***

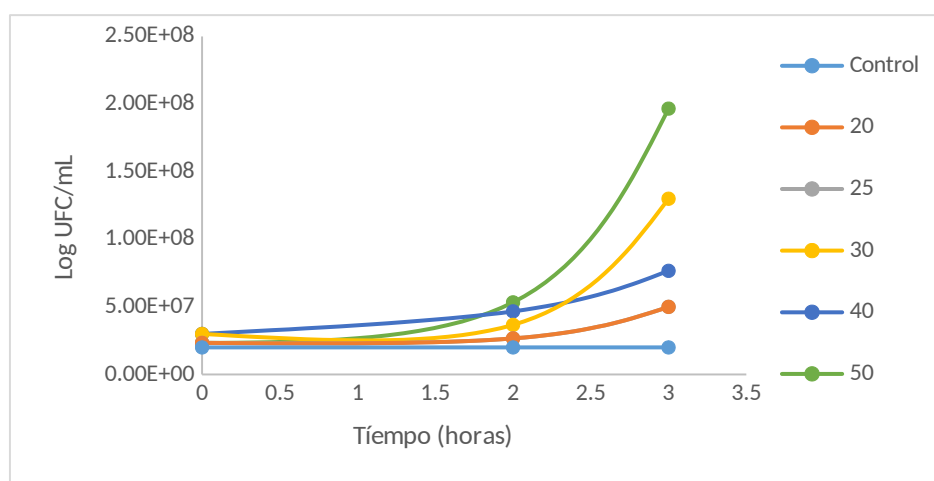
Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana de *MoSe* con la extracción del aceite mediante la técnica del TECAN. Los resultados se pueden evidenciar en la Figura 34. Se observó que hubo diferencia significativa ( $p < 0.005$ ) entre los tratamientos con el control. Sin embargo, la disminución en la densidad óptica fue menor al que se presentó con *MoSe*.

Adicionalmente, no se observa diferencia significativa ( $p > 0.005$ ) entre la variación de la densidad óptica en las concentraciones de 20 a 50% del extracto.



**Figura 34.** Determinación de la inhibición de *E. coli* a diferentes concentraciones del extracto de las semillas de *M. oleífera* sin aceite.

Al realizar la prueba de extracción del aceite utilizando como disolvente etanol, al realizar el conteo de las bacterias se observó que no presentó ningún efecto inhibitorio, el crecimiento celular era directamente proporcional a la concentración del extracto de las semillas como se observa en la Figura 35.



**Figura 35.** Determinación de la inhibición de *E. coli* a diferentes concentraciones del extracto de las semillas de *M. oleífera* sin aceite utilizando etanol como disolvente.

Este efecto que presentó *MoSe* posiblemente pudo deberse a la influencia del solvente etanol, ya que estudios realizados por Abolore et al. (2015) demuestran que dentro de las semillas se encuentran compuestos fitoquímicos como son; alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, terpenoides, anillos esteroidales entre otros, en el cual utilizaron 3 tipos de solventes para la extracción de cada uno de estos compuestos y determinaron que al utilizar etanol como solvente lograron extraer las saponinas. Así mismo, las investigaciones con saponinas y sus mecanismos para perturbar las membranas celulares Botger et al. 2011 evidenciaron que la actividad de superficie de una saponina es vinculada a su permeabilización de la membrana y actividad hemolítica, pero también a su potencial citotóxico, conclusión similar al estudio realizado por Liu et al. (2017) donde explican que la adición de saponinas puede aumentar la transferencia de masa y la permeabilización del plasma de la membrana y realizar una modificación de la hidrofobicidad celular de las bacterias.

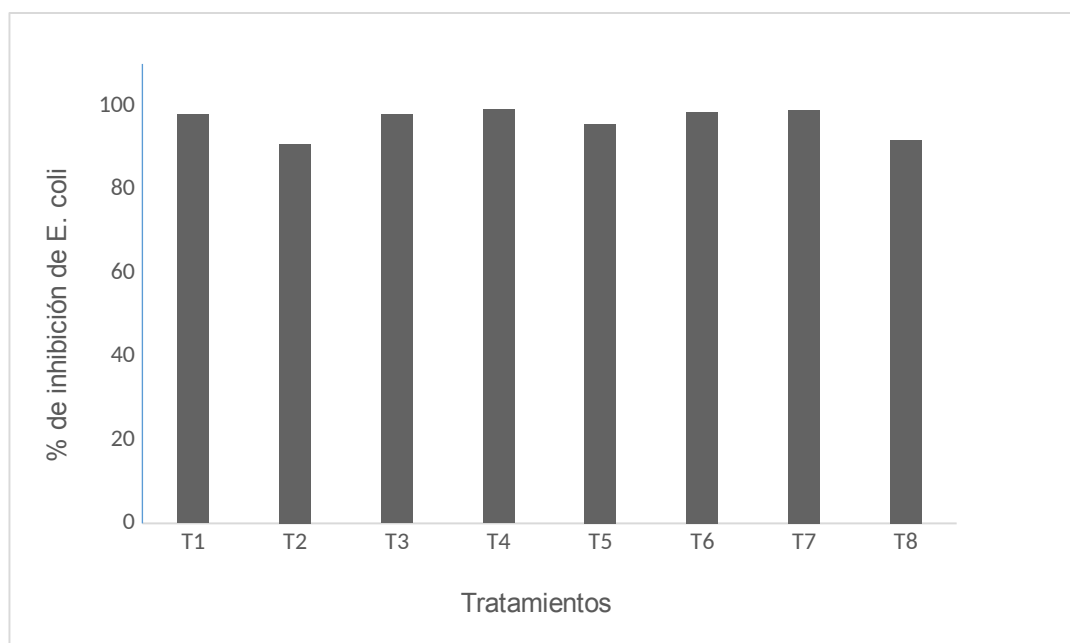
### **7.3. Funcionalización del soporte**

#### **7.3.1. Extracto de las semillas de *M. oleífera* con grava sobre la inhibición celular de *E. coli***

Se utilizó un biofiltro funcionalizado con *MoSe* en un material filtrante de corcho utilizando un diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  para aumentar la reducción de las unidades logarítmicas de *E. coli*. Al realizar el análisis estadístico se obtuvo en el ANOVA del procedimiento lineal generalizado (GLM) un nivel de significancia de  $p < 0.0001$ , presentando una correlación positiva moderada alta donde los factores independientes que presentaron un efecto significativo fueron la aireación, CMC, tamaño de partícula y tiempo de lisis. Adicionalmente, el ajuste del modelo de regresión lineal fue  $p < 0.0001$  y  $R^2 = 0.81$  y la ecuación del modelo fue la siguiente:  $\ln h(\%) = 98.42 + 0.20 \text{ Air} - 0.12 \text{ Tp} - 0.35 \text{ TI}$  siendo los factores independientes

significativos la aireación (nivel alto), tamaño de partícula (nivel bajo) y tiempo de lisis (nivel bajo).

Se obtuvo un porcentaje cercano al 99% de reducción de la bacteria en la mayoría de los tratamientos como se observa en la siguiente Figura 36.

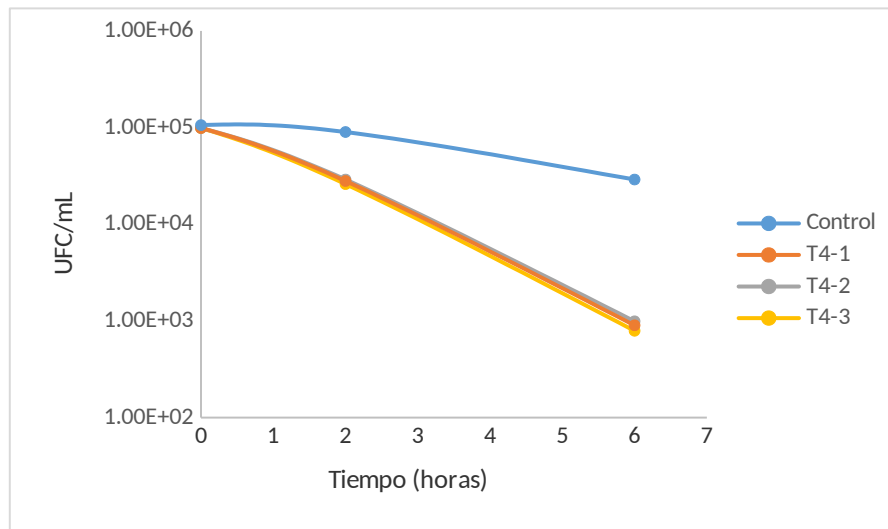


**Figura 36.** Porcentaje de inhibición de *E. coli* utilizando los biofiltros utilizando soporte de gravilla funcionalizados con los extractos de *M. oleifera*.

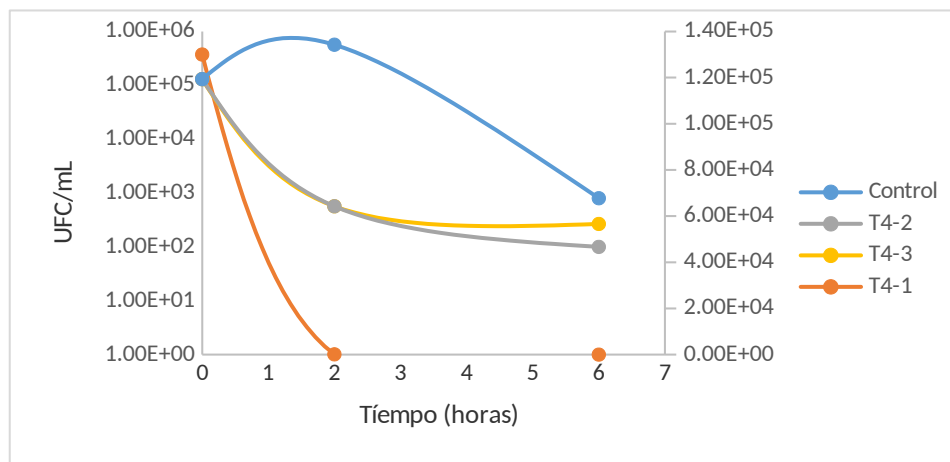
Al realizar la comparación de medias entre tratamientos utilizando la prueba LSD se observó diferencias formándose 3 grupos: (4 y 7), (3, 1 y 6) y (2, 8 y 5). Evidenciando al tratamiento 4 fue el que obtuvo mayor % de remoción de *E. coli* a diferencia de los otros tratamientos. El presente tratamiento estuvo conformado por los siguientes factores tiempo de secado de 100 °C, aireación de 643 s/mL, concentración de 5%, conductividad 1500  $\mu\text{s}/\text{cm}$ , tamaño de partícula 0.86 mm y 2 horas de tiempo de lisis celular. El presente estudio obtuvo resultados similares que los realizados por Garcia et al. (2003) y Schulze-Makuch (2003) evidenciando que materiales adsorbentes utilizados en sistemas de humedales como zeolita modificada con biosurfactantes presentaron procesos de adsorción entre 99-100% de *E. coli*, mientras que el material granular grueso con un tamaño de partícula de

(5-25 mm) inactiva entre 0.1 - 2.7 unidades logarítmicas de *E. coli*. Sin embargo, se evidenció que entre más fino sea el material con un tamaño de partícula entre 2-13 mm puede alcanzar una inactivación bacteriana de 0.7 a 3.4 UFC/mL.

A continuación, en la Figura 37 se observa en la prueba de viabilidad mediante el recuento en placa que el sistema de biofiltración de vidrio con grava funcionalizada alcanzando a reducir 3 unidades logarítmicas de *E. coli* iniciando con una concentración de  $1.05 \times 10^5$  UFC/mL a  $7.9 \times 10^2$  UFC/mL. Mientras que en el sistema de biofiltración utilizando cartuchos de PVC con una concentración mayor del 5% alcanzo a reducir 4 unidades logarítmicas de *E. coli* como se observa en la Figura 42, alcanzando un 99.99% de remoción de la bacteria.



**Figura 37.** Inhibición de *E. coli* con el sistema de biofiltración de vidrio con una concentración las semillas de Moringa del 5%.

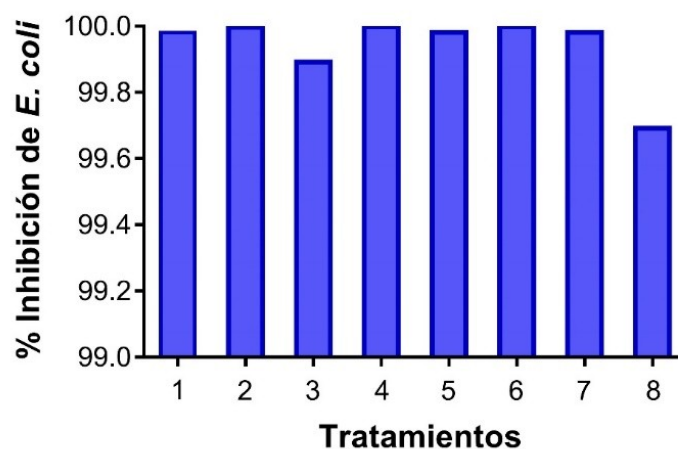


**Figura 38.** Inhibición de *E. coli* con el sistema de biofiltración con cartuchos de PVC con una concentración las semillas de Moringa del 30%.

### 7.3.2. Reducción de *E. coli* con el biofiltro funcionalizado con el extracto de las semillas de *M. oleífera* utilizando corcho como material filtrante

Se utilizó un biofiltro funcionalizado con *MoSe* en un material filtrante de corcho utilizando un diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  para evaluar la actividad antimicrobiana sobre la inhibición de *E. coli*. Al realizar el análisis estadístico se obtuvo en el ANOVA del procedimiento lineal generalizado (GLM) un nivel de significancia de  $p > 0.0001$ , presentando una correlación positiva moderada donde el único factor independiente que un efecto significativo fue la aireación. Adicionalmente, el ajuste del modelo de regresión lineal fue  $p > 0.0001$  y  $R^2 = 0.52$  y la ecuación del modelo fue la siguiente:  $Inh(\%) = 99.95 - 0.039Air$  siendo el factor independientes significativos la aireación (nivel bajo).

Se observó un porcentaje  $> 99.99\%$  de reducción de la bacteria en los tratamientos 2, 4 y 6 como se observa en la Figura 39.



**Figura 39.** Porcentaje de inhibición de *E. coli* utilizando corcho funcionalizados con el extracto de *M. oleífera*.



Al realizar la comparación de medias entre tratamientos utilizando la prueba LSD se observó diferencias formándose 2 grupos: (6, 4, 2, 1 y 5) y (7, 3 y 8). Evidenciando al tratamiento 6, 4, y 2 con el mayor % de remoción de *E. coli* a diferencia de los otros tratamientos, el factor independiente en el cual se observó un efecto significativo fue la aireación con un nivel bajo (sin aireación), así mismo, el factor independiente de recirculación nivel alto (6.5 mL/s) fue común entre estos tratamientos, el tratamiento 6 estuvo conformado por los siguientes factores; Rec (6.5mL/s), sin aireación, conc de *M. oleífera* (20 mg/L cond (1500  $\mu$ s/cm) TRH (12 horas), TP (3 cm) y 2 horas de tiempo de lisis celular. El tratamiento 4 estuvo conformado por los siguientes factores; rec (6.5mL/s), aireación, concentración del extracto de las semillas de *M. oleífera* (20 mg/L) conduc (1500  $\mu$ s/cm) TRH (6 horas), TP (3 cm) y 2 horas de TL.

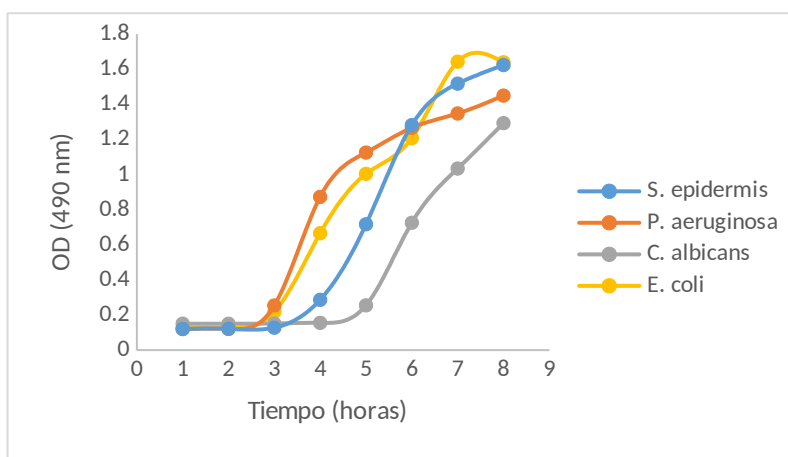
En el presente estudio se funcionalizó las semillas de *M. oleífera* en el corcho obteniendo un porcentaje de inhibición de la bacteria >99.99% con el tratamiento 4, iniciando con una concentración de inóculo de  $10^5$  cel/ml en el inicio de los tratamientos, evidenciándose a las dos horas de lisis celular una disminución de la concentración bacteriana de  $3.52 \times 10^2$  y a las 6 horas de TRH se observó una concentración de  $3.8 \times 10^1$ . En el tratamiento 6 se observó que en el TL de 3 horas se obtuvo una concentración celular de  $3 \times 10^1$  y en el TRH mayor de 12 horas alcanzo una inhibición celular  $< 10^1$ .

Durante la realización de los experimentos se observó el aumento del potencial antimicrobiano de *MoSe* funcionalizada en el corcho, estos resultados fueron similares a estudios que se enfocan en modificar y acondicionar la matriz con nanopartículas de oro y plata. Sin embargo, unas de las razones por las que *MoSe* aumentó su potencial puede ser justificado por el estudio realizado por Francesko et al. (2015) quienes ensamblaron un biopolímero con lacasa y nanopartículas de plata en corcho para la remoción de patógenos en aguas residuales e indicó que la composición química del corcho depende de su origen y varía entre 40-60% de suberina, 10-50% de lignina, 5-15% de polisacáridos y 10-25% de extraíbles componentes que incluyen ceras y taninos. Las moléculas de lignina, suberina y

tanino poseen gran número de restos fenólicos, que pueden ser oxidados enzimáticamente en quinonas reactivas que puede reaccionar más con los grupos amino de los biopolímeros, así mismo, la inmovilización covalente de biopolímeros en corcho puede impartir un efecto antibacteriano duradero y mejorar sinérgicamente el efecto antibacteriano.

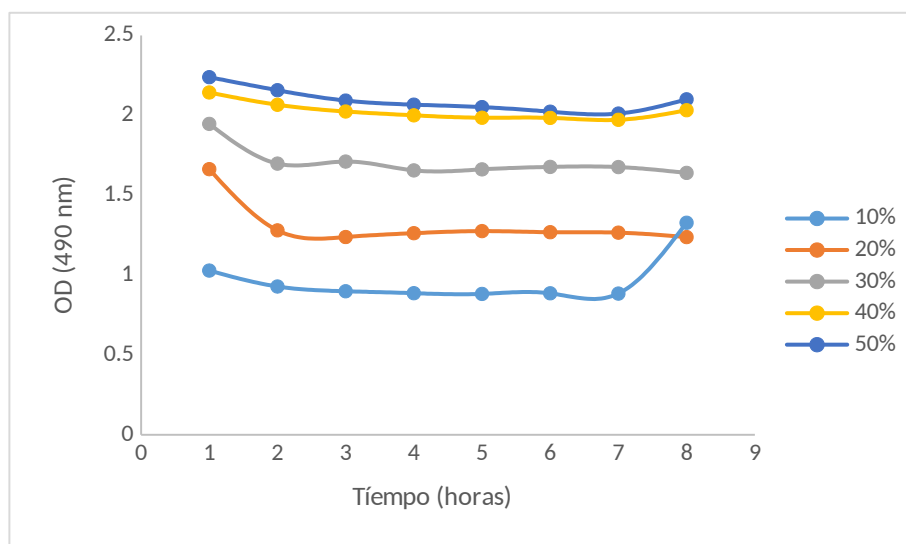
#### 7.4. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de las semillas de *M. oleifera* sobre *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Staphylococcus epidermis*

Inicialmente se evaluó la cinética de crecimiento de las bacterias sometidas al extracto de la semilla mediante densidad óptica en medio BHI A 37 °C para determinar previamente sus fases exponenciales de crecimiento, *P. aeruginosa* y *E. coli* como se observa en la figura 40, donde presentaron el mismo inicio de tiempo de crecimiento a las 3 horas. Sin embargo, a las 8 horas se presentó el mayor crecimiento celular mientras que *E. coli* fue a las 7 horas, así mismo, *S. epidermis* y *C. albicans* tuvieron una fase de latencia mayor que las otras cepas, presentando un inicio de crecimiento celular a las 5 horas y 6 horas respectivamente. Esta prueba (CMI) se realizó adicionalmente como control para confirmar el crecimiento de las bacterias.



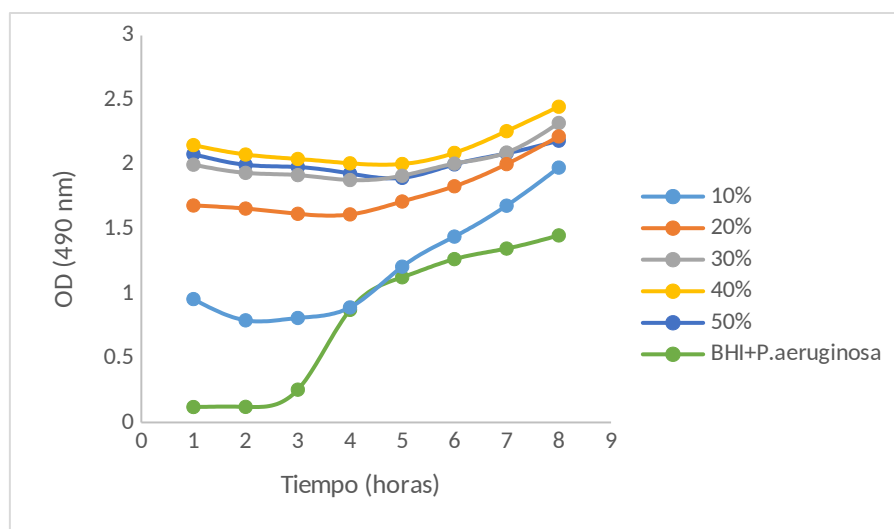
**Figura 40.** Cinética de crecimiento con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.

A continuación, en la Figura 41 se observó en la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de las semillas de *M. oleifera* sobre *Staphylococcus epidermis* que a una concentración del 10% de MoSe inhibió el crecimiento del microorganismo hasta un tiempo de 7 horas, al utilizar una concentración del 20% del extracto de la semilla se evidenció una inhibición completa del microorganismo durante todo el tiempo de la prueba. Al comparar estos resultados con los estudios realizados por Zhiqiang et al. (2009) donde estudio la inhibición de la formación de biofilm de *S. epidermis* con compuestos orgánicos (2 benzoatos y 2 carboxamidas) indicando presentando efectos inhibitorios, así mismo, los estudios realizados por Scopel et al. (2014) evidenciaron un compuesto aislado de hongos marinos asociado a la interferencia con la adherencia y la formación de biopelículas de *S. epidermidis* indicando que es un patógeno oportunista importante relacionado con infecciones nosocomiales en dispositivos médicos residentes debido a la formación de biopelículas, por tal razón, el extracto de las semillas de *M. oleifera* podría actuar como un agente importante contra este patógeno, contribuyendo al arsenal de compuestos de antibiofilm.



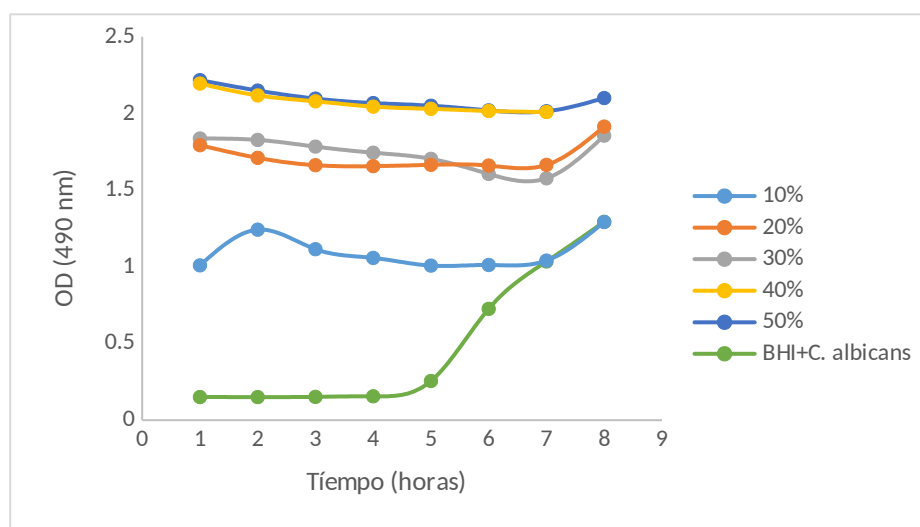
**Figura 41.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de *M. oleifera* a diferentes concentraciones sobre *S. epidermis* con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.

Adicionalmente, se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de MoSe sobre *P. aeruginosa* como se muestra en la Figura 42, donde se observó la inhibición del microorganismo a partir de una concentración del 20%, sin embargo, hay un aumento del crecimiento celular bacteriano a las 5 horas, presentándose como una de las cepas más resistentes al efecto inhibitorio de la semilla. Estos resultados evidencian la resistencia de *P. aeruginosa* a la actividad antimicrobiana que se encuentra presente en los compuestos fitoquímicos de las semillas, al comparar estos resultados con los estudios realizados por Rocha et al. (2019) indican algunos mecanismos utilizados por la cepa para aumentar su efecto resistente ante los antibióticos realizando la misma prueba de CMI en medio MHB ya adaptadas adquieren mayor propiedad resistente; una de los mecanismos demostrados en diferentes publicaciones lo contribuyen a los genes que le otorgan esa propiedad de resistencia a los antibióticos (resistoma intrínseco) donde comprenden alrededor del 3% del genoma una especie bacteriana determinada, es a causa de su mutación o transposones que ha demostrado la resistencia a la tobramicina de bajo nivel (Schurek et al. 2008). Así mismo, otro mecanismo de resistencia bacteriana es explicado por los estudios realizados por Zhao et al. (2020) donde indican la detección de quórum sensing o las feromonas bacterianas son moléculas llamadas auto inductor segregadas por bacterias para regular algunas funciones, como la resistencia a los antibióticos y la formación de biopelículas, adicionalmente, QS es un sistema de estímulos y respuestas en relación con la densidad de población de células bacterianas que regula la expresión de genes, incluidos los determinantes de virulencia.



**Figura 42.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de *M. oleifera* a diferentes concentraciones sobre *P. aeruginosa* con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.

Finalmente, se evaluó de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *MoSe* sobre *Candida albicans* como se observa en la Figura 43.



**Figura 43.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de las semillas de *M. oleifera* a diferentes concentraciones sobre *E. coli* con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.

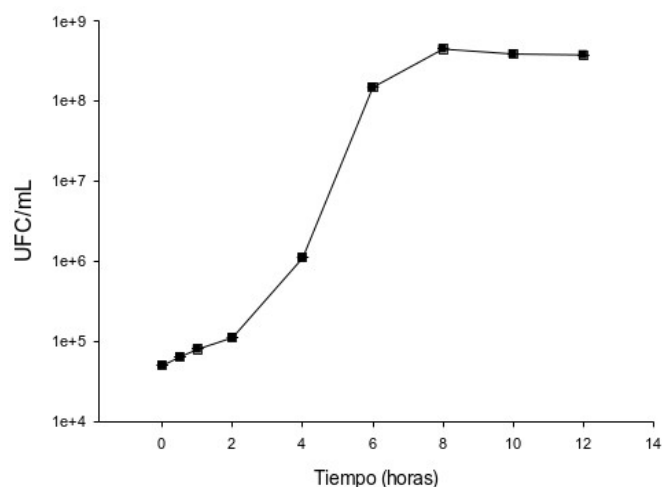
Se evidenció el efecto inhibitorio desde la menor concentración de 10% hasta las 7 horas. Sin embargo, a las 8 horas se observa el incremento celular de *C. albicans*, estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio realizado por Nepolean et al. (2009) donde realizaron la extracción de las semillas, hojas y flores de *M. oleifera* evidenciando la actividad bacteriana y antifúngica, aunque, en *MoSe* y hojas de *M. oleifera* se obtuvo un efecto inhibitorio sobre bacterias como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aerus* y *C. albicans* con concentraciones desde (50-200 mg) no se evidenció algún efecto inhibitorio en *C. albicans* con los extractos de las flores de la planta. Por tal razón, el autor evidenció en el estudio que al realizar la identificación de los compuestos químicos y metabolitos secundarios de las semillas mediante GC-MS se obtuvieron fito-constituyentes como taninos, saponinas, flavonoides, glucósidos, terpenoides en los extractos de las hojas. Los taninos, saponinas, flavonoides y terpenoides han sido identificados a partir de extracto de las semillas. Taninos, flobatina, esteroides, glucósidos, saponinas y los flavonoides se identificaron a partir del extracto de las flores. La presencia de estos constituyentes explica la actividad antimicrobiana de las plantas.

#### **7.5. Estandarización de la técnica molecular qPCR de viabilidad para evaluar la eficiencia del sistema de biofiltros con corcho funcionalizados del extracto de las semillas de *Moringa* sobre la inhibición de *E. coli***

##### **7.5.1. Cinética de crecimiento, amplificación, clonación del gen *LacZ* y curva estándar de *E. coli***

Se identificó la cepa de referencia de *E. coli* NBRC 102203 y la secuencia en Gen Bank con el siguiente número de acceso (NR\_114042.1). Las fases celulares de crecimiento exponencial se observaron a las 8 h la fase de latencia hasta las 12 h, como se observa en la figura 44. La concentración celular obtenida a las 8 horas fue de  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL, aunque a las 6 horas la concentración celular alcanzó un valor de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, este valor de concentración celular es suficiente para

extraer una cantidad significativa de ADN en muestras de agua contaminadas con *E. coli* (Yuan et al. 2018).



**Figura 44.** Cinética de crecimiento de la cepa de *E. coli*

Posteriormente a la identificación, se procedió a realizar la extracción de ADN. En total se realizaron 7 extracciones de *E. coli* en tres periodos distintos. A continuación, se analizaron las muestras en un Nanodrop 1000, con el fin de determinar la concentración y pureza de cada una y evidenciar si cumplían con los requisitos para la amplificación por PCR. Los resultados del análisis de concentración y pureza se pueden observar en la Tabla 31.

**Tabla 31.** Concentración y pureza obtenida de las extracciones de la cepa de *E. coli* ATCC 8739

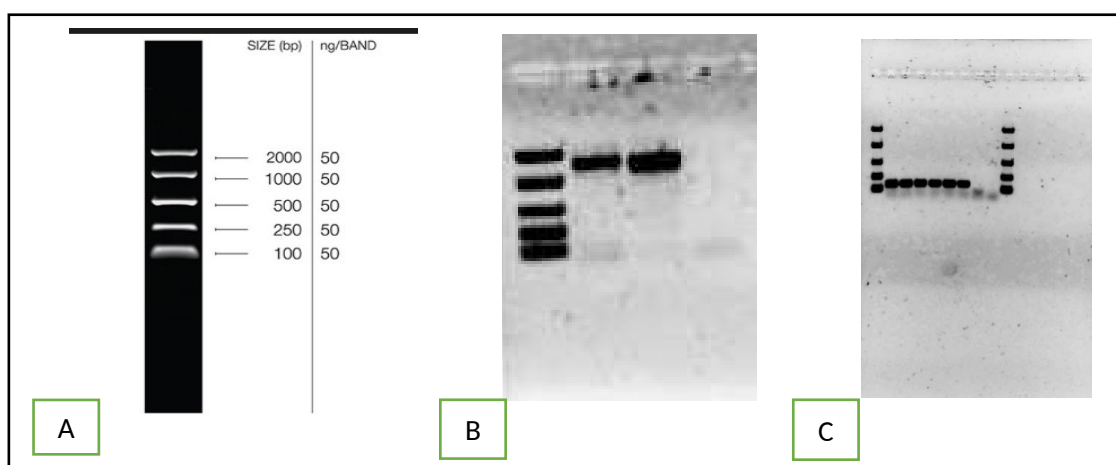
muestras	ADN (ng/uL)	260/280	260/230
1	58	1.92	2.06
2	41.7	1.74	1.87
3	49.1	1.94	2.65
4	52.1	1.82	1.73
5	61.9	2.09	2.58
6	52.7	1.95	2.44

*7	2.5	1.28	0
----	-----	------	---

\*La última muestra analizada corresponde a un control negativo

### 7.5.2. Amplificación del gen 16S y *LacZ*

A continuación, en la Figura 45 se observa el gel de electroforesis correspondiente a la amplificación del gen 16S ARNr *E. coli* ATCC 8739 descrito anteriormente por James et al. (2006). Para la amplificación se utilizaron los primers 27f, 1492r y se evidenció un resultado positivo en los primeros seis pocillos con bandas entre los pesos moleculares de 1492-1513 pb; datos consistentes con lo reportado anteriormente James et al. (2004). Adicionalmente, en la Figura 45C, se observa el gel de electroforesis obtenido como resultado de la amplificación del gen *LacZ*, para el cual se utilizaron los primers forward 5'-3' (GGATCTGCCATTGTCAGACATG) y reverse 5'-3' (CTGTTGACTGTAGCGGCTGATG) presentando consistencia con el peso molecular reportado en el estudio de Foulds et al. (2002) donde se obtuvo un resultado positivo para la amplificación con un peso molecular de 142 pb confirmando la expresión del gen que codifica para la enzima (***β-D-galactosidasa***) presente en las muestras garantizando la presencia de *E. coli* ATCC 8739.



**Figura 45.** Amplificación del gen 16S ARNr; Escala estándar de ADN (A); Electroforesis del gen 16S ARNr (B); Electroforesis del gen *LacZ* de *E. coli* ATCC 8739 (C).



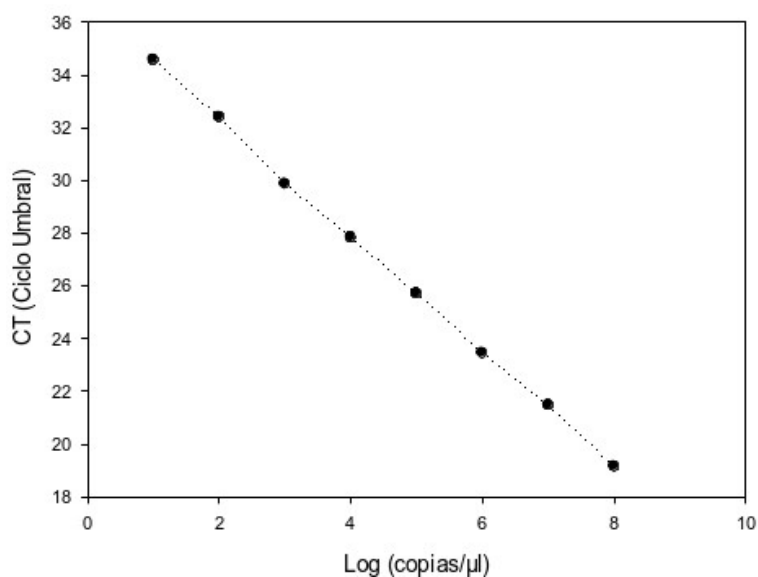
### **7.5.3. Curvas estándar del gen *LacZ***

El procedimiento utilizado para la elaboración de la curva estándar fue descrito por el estudio de Foulds et al. (2002) en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Las diferentes diluciones de una solución de concentración conocida permitieron obtener una recta que relaciona la concentración con el valor CT o ciclo umbral. Este valor indica el número de ciclo en el que la fluorescencia generada en una reacción cruza el umbral de fluorescencia y, por lo tanto, hay amplificación. Valores bajos de CT indican altas cantidades de gen *LacZ* de estudio, mientras que valores altos indican lo contrario. En la Tabla 32 se muestran las concentraciones y purezas obtenidas de las muestras y en la figura la ecuación de la recta.

**Tabla 32.** Concentración y pureza obtenida de las extracciones de las diluciones en serie para la realización de la curva estándar de la cepa de *E. coli* ATCC 8739 mediante Qubit.

<b>Muestras Diluciones</b>	<b>ADN (ng/mL)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>10<sup>8</sup></b>	500	2.01	1.95
<b>10<sup>7</sup></b>	361	2.15	2.91
<b>10<sup>6</sup></b>	222	2.13	2.34
<b>10<sup>5</sup></b>	20.4	1.69	0.93
<b>10<sup>4</sup></b>	<0.50	1.23	0.56
<b>10<sup>3</sup></b>	<0.50	1.25	0.55
<b>10<sup>2</sup></b>	<0.50	1.54	0.47
<b>10<sup>1</sup></b>	<0.50	1.6	0.33

Así mismo, se realizó la curva estándar del gen *LacZ* para estimar la concentración celular presente en las diluciones en la cuantificación del gen *LacZ* y la viabilidad de *E. coli* (Figura 46). Los resultados en el ciclo umbral (CT) observado por reacción en cadena de la polimerasa. La concentración de microorganismos en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de ADN objetivo y, por lo tanto, los límites de detección fueron de 10<sup>1</sup> a 10<sup>8</sup> cel/mL, lo que dio un valor medio de CT de 34.57 y 19.15, respectivamente. La regresión lineal fue ( $R^2 = 0.996$ ). Los estudios de Fiksdal y Tryland (2008) indicaron que el gen *LacZ* induce la actividad  $\beta$ -D-galactosidasa y se seleccionó como un buen marcador para aislar *E. coli* en aguas ambientales para detectar en métodos rápidos.



**Figura 46.** Curva Estándar del gen *LacZ*.

#### 7.5.4. Ensayo vqPCR del gen *LacZ*

Se utilizó un biofiltro funcionalizado con *MoSe* en un material filtrante de corcho utilizando un diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  para evaluar la viabilidad de *E. coli* en dos tiempos (0 y 6 horas) como se observa en la Tabla 33 y 34, respectivamente.

Inicialmente, en la Tabla 33 se muestran los resultados obtenidos de la qPCR con un total de 45 ciclos para el tiempo inicial (0 horas), obteniendo un desplazamiento de CT mayor en el control negativo utilizando el tratamiento con PMA, a este valor de desplazamiento del CT indica el número de ciclos en el que la fluorescencia generada en una reacción cruza el umbral de fluorescencia y, por lo tanto, hay amplificación del gen *LacZ*.

En el tiempo (0 horas) donde la suspensión bacteriana de  $10^8$  células/mL en la solución y las condiciones del tratamiento 2 aplicado en el sistema de biofiltración.

Adicionalmente, se adicionó el tratamiento con el PMA y la extracción del DNA las muestras, finalmente se realizó la qPCR y se obtuvo los siguientes resultados como se observa en la Tabla 33.

**Tabla 33.** Efecto del sistema de biofiltración sobre *E. coli* en el tiempo inicial (0 horas) utilizando vqPCR con y sin PMA.

<b>Muestras</b>	<b>copias/ml</b>	<b>Log (copias/mL)</b>	<b>CT</b>
<b>CCP</b>	1.19E+07	7.07554696	21.84
<b>CCP</b>	1.32E+07	7.12057393	21.79
<b>CSP</b>	4.82E+07	7.68304704	21.08
<b>CSP</b>	8.87E+08	8.94792362	19.51
<b>R1CP</b>	2.90E+06	6.462398	23.61
<b>R1CP</b>	5.42E+06	6.73399929	23.27
<b>R1SP</b>	8.61E+06	6.93500315	22.03
<b>R1SP</b>	2.10E+07	7.32221929	21.53
<b>R2CP</b>	3.00E+06	6.47712125	22.59
<b>R2CP</b>	3.90E+06	6.59106461	22.44
<b>R2SP</b>	1.47E+07	7.16731733	21.73
<b>R2SP</b>	1.58E+07	7.19865709	21.69
<b>BMCP</b>	5.10E+01	1.70757018	33.56
<b>BMCP</b>	2.40E+01	1.38021124	33.95
<b>BMSP</b>	3.77E+06	6.57634135	23.47
<b>BMSP</b>	1.26E+07	7.10037055	21.81
<b>BVCP</b>	4.44E+06	6.64738297	23.38
<b>BVCP</b>	4.03E+07	7.60530505	21.18
<b>BVSP</b>	4.80E+07	7.68124124	21.06
<b>BVSP</b>	8.86E+08	8.94743372	19.5

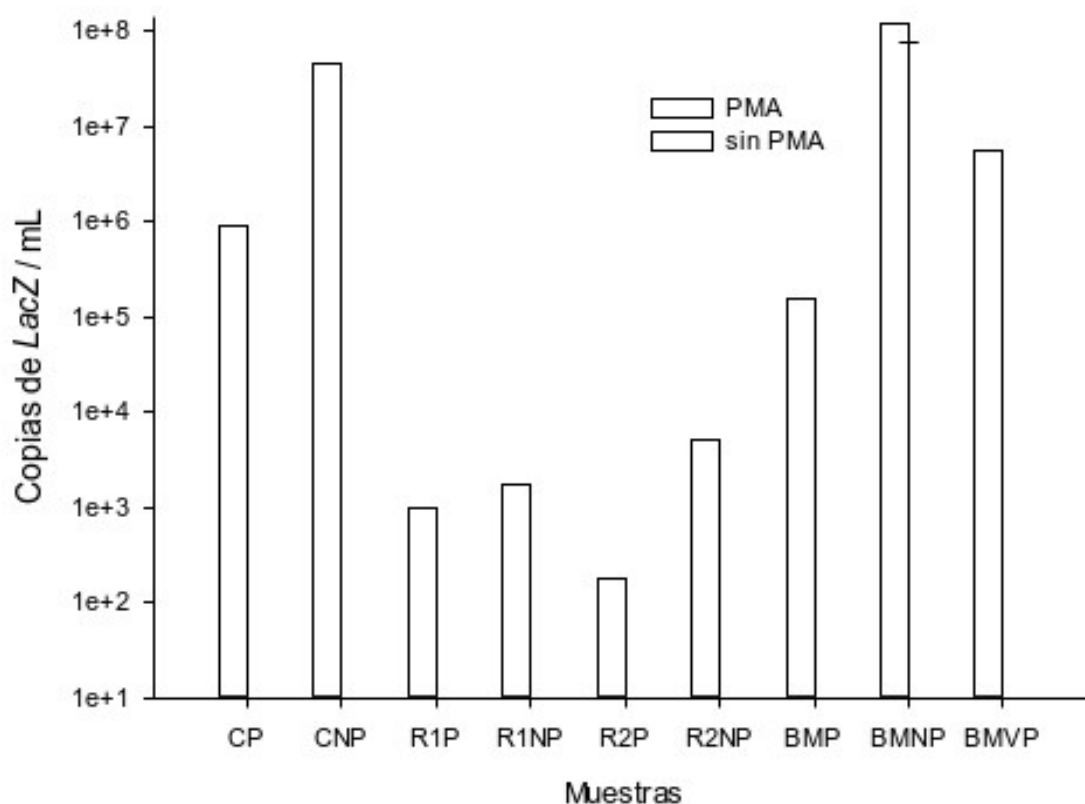
Nota: Control de biofiltro sin funcionalizar el corcho con PMA (CCP); Control de biofiltro sin funcionalizar sin PMA (CSP); Replica 1 de biofiltro con corcho funcionalizado y PMA (R1CP), Replica 1 de biofiltro con corcho funcionalizado sin PMA (R1SP); Control de bacterias de la solución con PMA (BMCP); Control de bacterias muertas de la solución sin PMA (BMSP); Control de bacterias vivas de la solución con PMA (BVCP), Control de bacterias vivas de la solución sin PMA (BVSP); El valor de CT indica el número de ciclos en los que la fluorescencia generada en una reacción cruza el umbral y, por tanto, hay amplificación del gen *LacZ*.

A continuación, se puede distinguir una amplia variación entre la TC de las muestras obtenidas en el qPCR, entre el control de bacterias muertas de la solución sin PMA (BMSP) donde se obtuvo un valor de  $CT > 6.65$ . Al realizar el análisis estadístico de los datos de CT, se obtuvo un ANOVA con un valor  $p < 0,0001$ , lo que evidencia que hay una diferencia significativa, al ajustar el modelo de regresión lineal, se obtuvo un valor de  $R^2 = 0.96$ . Además, se anticipó la amplificación para los 5 grupos de muestras diferentes. Los valores de CT de las células vivas tratadas con PMA (BVCP), pueden ser ligeramente más altos en comparación con el control sin PMA de las células vivas (BVCP). Esto se debe a una porción de células muertas que ocurre en un cultivo microbiano. Este cambio de CT generalmente varía entre 1 y 3 valores de CT. La muestra control de células muertas tratadas con PMA (BMCP), debe exhibir un cambio de CT prominente en comparación con las células muertas sin PMA (BMSP). Este cambio de CT demuestra el efecto de enmascaramiento de PMA para el control respectivo, el cambio de 6.65 CT deja muy claro distinguir entre células que están vivas o muertas.

Con respecto a los resultados de las copias genómicas, era evidente que el valor de las muestras en el tiempo inicial de (0 horas) que se muestra en la Figura 47, no indicó un gran cambio entre ellas, el número de copias genómicas permaneció en un rango de  $10^6 - 10^8$  copias genómicas/mL. Sin embargo, en el tratamiento de control si se obtuvo una gran diferencia en la concentración del gen con un cambio de  $10^6 - 10^1$  copias genómicas/mL, evidenciando el tratamiento con PMA y sin PMA, se debe tener en cuenta que, en este control, se usó calor para eliminar las bacterias.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la Tabla 35, utilizando el tratamiento 2 con el tiempo inicial (0 horas), el ANOVA del procedimiento lineal generalizado (GLM) obtuvo un valor de nivel con los resultados del número de copia genómica. de significancia de  $p < 0.0001$  que

muestra que no hay diferencia significativa, presentando una alta correlación positiva. Asimismo, el ajuste del modelo de regresión lineal fue  $p < 0.0001$  y  $R^2 = 0.99$ . En la siguiente Figura 47, los valores iniciales del tratamiento del sistema de biofiltro se muestran en términos de número de copias genómicas en el tiempo 0.



**Figura 47.** Número de copias de gen respecto ng ADN.

A continuación, se muestran los resultados del tiempo final (6 horas) donde se agregó la suspensión bacteriana de  $10^5$  células/mL en la solución en el sistema de biofiltración, consecutivamente finalizada las 6 horas, se tomó el volumen de la solución y se aplicó el tratamiento con el PMA y la extracción del DNA de las muestras. Finalmente, se realizó la qPCR y se obtuvo los siguientes resultados como se observa en la Tabla 34.

**Tabla 34.** Efecto del sistema de biofiltración sobre *E. coli* en el tiempo final (6 horas) utilizando vqPCR con y sin PMA.

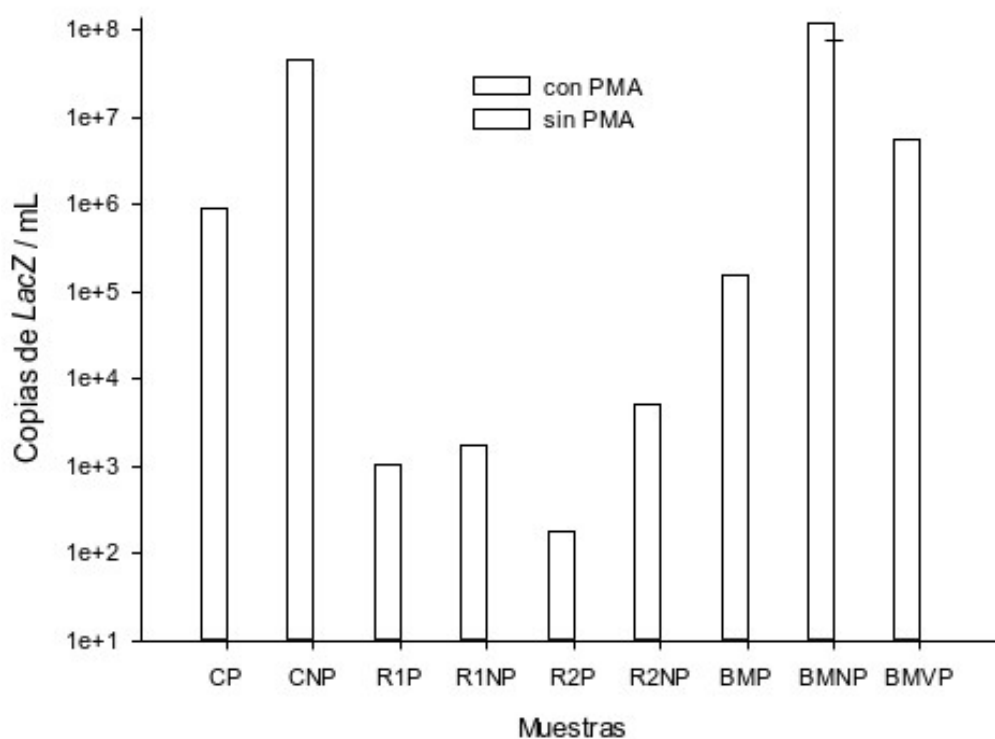
Muestras	copias/ml	Log (copias/mL)	CT
CCP	3.65E+05	5.56229286	25.02
CCP	1.40E+06	6.14612804	23.87
CSP	7.33E+07	7.86510397	21.66
CSP	1.70E+07	7.23044892	21.15
R1CP	7.04E+02	2.84757266	31.81
R1CP	1.31E+03	3.1172713	31.55
R1SP	2.12E+03	3.32633586	29.76
R1SP	1.43E+03	3.15533604	29.14
R2CP	1.13E+02	2.05307844	30.72
R2CP	2.46E+02	2.39093511	31.96
R2SP	6.25E+03	3.79588002	29.24
R2SP	3.73E+03	3.57170883	29.42
BMMCP	1.06E+05	5.02530587	25.08
BMMCP	1.98E+05	5.29666519	25.62
BMMSP	1.16E+08	8.06445799	19.58
BMMSP	1.24E+08	8.09342169	19.11
BMVCP	7.42E+06	6.87040391	23.53
BMVCP	3.48E+06	6.54157924	23.84
BMVSP	7.69E+07	7.88592634	21.86
BMVSP	7.62E+07	7.88195497	21.88

Nota: Control de biofiltro sin funcionalizar el corcho con PMA (CCP); Control de biofiltro sin funcionalizar sin PMA (CSP); Replica 1 de biofiltro con corcho funcionalizado y PMA (R1CP), Replica 1 de biofiltro con corcho funcionalizado sin PMA (R1SP); Control de bacterias de la solución con PMA (BMCP); Control de bacterias muertas de la solución sin PMA (BMSP); Control de bacterias vivas de la solución con PMA (BVCP), Control de bacterias vivas de la solución sin PMA (BVSP); El valor de CT indica el número de ciclos en los que la fluorescencia generada en una reacción cruza el umbral y, por tanto, hay amplificación del gen *LacZ*.

Para este tratamiento, el cambio principal evidenciado fue el cambio de CT del control negativo donde se utilizó temperatura (70 °C) para matar las bacterias en la muestra y se usó PMA para diferenciar el tipo de enmascaramiento de los

microorganismos vivos y muertos. El valor de CT cambió para este caso donde se obtuvo un TC de 6. Al realizar el análisis estadístico de este tratamiento final, se obtuvo un valor  $p < 0.0001$  en el ANOVA, lo que evidencia que hay una diferencia significativa, presentando una correlación positiva. Asimismo, el ajuste del modelo de regresión lineal fue  $p < 0.0001$  y  $R^2 = 0.79$ .

Con respecto a los resultados de las copias genómicas, fue evidente que el valor de las muestras en el tiempo final de (6 horas) presentó una diferencia significativa  $p < 0.0001$ , el número de copias genómicas mostró un cambio entre las muestras con un rango de  $10^2 - 10^8$  copias genómicas/mL. En la muestra control, se obtuvo una gran diferencia en la concentración del gen con un cambio de  $10^8 - 10^5$  copias genómicas/mL, evidenciando la diferencia en el tratamiento con PMA y sin PMA, debe tenerse en cuenta que, en este control, se usó calor para eliminar bacterias como se muestra en la siguiente Figura 48.



**Figura 48.** Número de copias del gen con respecto a  $\mu\text{L}$  de ADN presente en el sistema de biofiltración utilizando el tratamiento 2 a las 6 horas.



---

---

Posteriormente, para evaluar la diferencia entre grupos del número de copias genómicas se realizó el análisis de medias con la prueba LDS Fisher (least significant difference) entre los tratamientos se obtuvo 5 grupos en los cuales no hay diferencia entre (R1CP Y R2SP) mientras que la diferencia para el CT se obtuvieron 3 grupos y no presentaron diferencia significativa (R2SP, CSP y BMSP).

Adicionalmente se observó una alta disminución de número de copias génicas en las réplicas (R1CP Y R2CP) respecto al control del biofiltro y al control negativo del tratamiento utilizando PMA, El **PMA** o *propidium monoazide* es una molécula intercalante con un grupo *azide* unido, que penetra solamente las células que tienen la membrana comprometida (consideradas muertas). Una vez ha penetrado en el interior de las células, se intercala en el ADN y en ser iluminada con luz visible se une al material genético. Eso es debido a un proceso de fotólisis del PMA en el que el grupo *azide* se convierte en un radical altamente reactivo que puede formar un enlace covalente con el DNA (Nocker et al. 2007).

El PMA que queda libre en el medio es a la vez inactivado al reaccionar con las moléculas de agua presentes. La unión de PMA al DNA resulta en una fuerte inhibición de la amplificación durante la PCR de tal manera que solo el material genético de las células no modificadas (células vivas con la membrana no comprometida) puede ser amplificado (Nogva et al. 2003; Rudi et al. 2005).

La disminución del número de copias génicas en el tratamiento del tiempo final (6 horas) a diferencia del tiempo inicial (0 horas) puede sustentarse a los estudios realizado por Kubota et al. (2008) donde indica que la capa más externa de bacterias Gram negativas se compone de lipopolisacárido, mientras que el de Gram positivas, la bacteria contiene una capa de peptidoglucano. Por lo tanto, se sugirió que las bacterias Gram negativas podrían tener afinidad entre la capa de lipopolisacáridos de las células y la superficie del material. Sin embargo, cabe el

corcho como el extracto de semillas de *M. oleifera* presenta compuesto fotoquímicos que podrían inferir en la afinidad de adherirse al material, Así mismo, en la Tabla 35 se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de viabilidad con la técnica molecular (% vqPCR) como se observa a continuación:

**Tabla 35.** Evaluación cuantitativa del gen *LacZ* con y sin PMA mediante vqPCR.

Tratamiento	Tiempo 0	Tiempo 6	% vqPCR
<b>CCP</b>	1.26E+07	8.83E+05	7.03
<b>CSP</b>	4.68E+08	4.52E+07	-
<b>R1CP</b>	4.16E+06	1.03E+03	0.024
<b>R1SP</b>	1.48E+07	1.78E+03	-
<b>R2CP</b>	3.45E+06	1.80E+02	0.005
<b>R2SP</b>	1.58E+07	6.25E+03	-
<b>BMCP</b>	3.75E+01	1.52E+05	0
<b>BMSP</b>	1.20E+08	1.20E+08	-
<b>BVCP</b>	2.24E+07	5.45E+06	16.40
<b>BVSP</b>	4.67E+08	7.66E+07	-

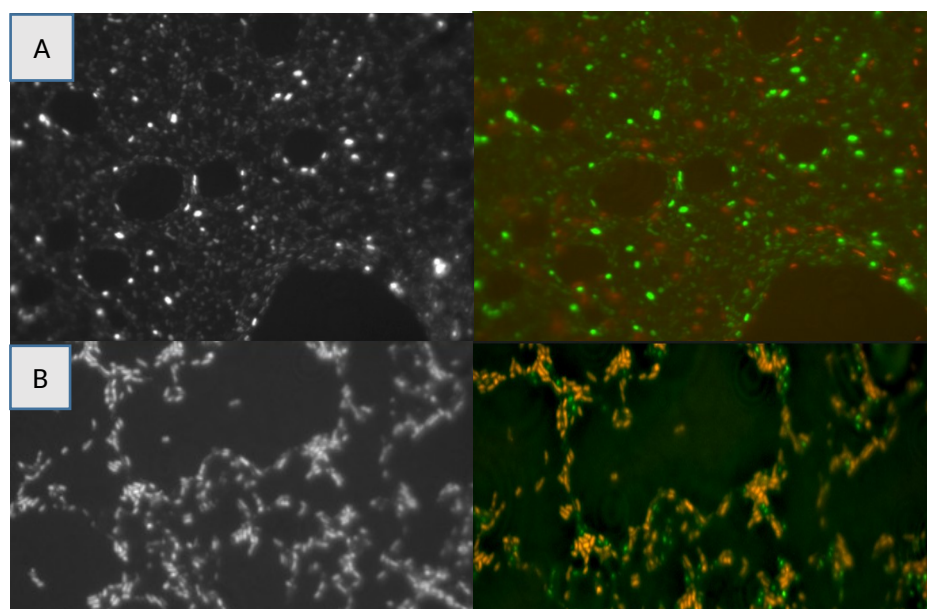
Control de biofiltro sin corcho-*f* con PMA (CCP), Control de biofiltro sin corcho-*f* sin PMA (CSP), Replicado de biofiltro con Cork-*f* y PMA (R1CP y R2CP), Replicado de biofiltro con Cork-*f* sin PMA (R1SP y R2SP), Control de bacterias muertas con PMA (BMCP), Control de bacterias muertas sin PMA (BMSP), Control de bacterias vivas con PMA (BVCP), Control de bacterias vivas sin PMA (BVSP),. Los datos representan la media de dos experimentos independientes realizados por duplicado. \*Los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad.

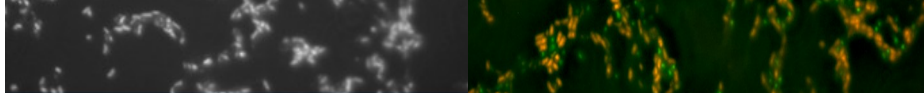
La PCR cuantitativa de muestras tratadas en un sistema de biofiltración con y sin PMA (vqPCR) se realizó con el propósito de evaluar la eficiencia de la funcionalización de corcho con *MoSe* mostraron notables diferencias. Se observó que para el número de copias/mL fueron constantes a lo largo del tiempo en muestras sin PMA (aproximadamente  $10^8$  copias/mL), a diferencia de las muestras tratadas con PMA. En el tiempo (0 h), medimos valores similares en las muestras tratadas y no tratadas. Después, en el tiempo final (6 h), una gran disminución en el número de copias / mL se observó en todo momento en las muestras tratadas con PMA, resultando en las réplicas (R1CP y R2CP) de  $1.03 \times 10^3$  y  $1.80 \times 10^2$ ,

respectivamente. La amplificación por PCR la eficiencia (% vPCR) se redujo fuertemente en las mismas muestras de las réplicas con el corcho funcionalizado con *MoSe*, se obtuvieron valores las células expuestas a PMA o de 0.024 y 0.005% de microorganismos viables. Estos resultados permiten evidenciar la interrupción de la pared celular en *E. coli* ATCC 8739. Así mismo, fue indispensable el uso del PMA ya que nos permitió determinar la disrupción de la membrana celular de la bacteria.

#### 7.5.5. Ensayo de viabilidad bacteriana de LIVE / DEAD utilizando grava como material filtrante

Se seleccionó el mejor tratamiento de un diseño experimental factorial fraccionado  $2^{7-4}$  del biofiltro funcionalizado con *MoSe*, para observar el efecto sobre la reducción de *E. coli*. Al realizar el análisis estadístico, se obtuvo en el ANOVA una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ), donde los factores independientes que presentaron un efecto significativo fueron la aireación, Concentración micelar crítica (CMC), tamaño de partícula (TP) y tiempo de lisis (TL). Adicionalmente, se obtuvo un porcentaje mayor al 99% de reducción de la bacteria en la mayoría de los tratamientos. El que presentó una mejor reducción de *E. coli* fue el tratamiento 4. Por tal razón, se seleccionó como aquella prueba considerada apta para la realización de la prueba LIVE/DEAD para confirmar la perturbación de membrana celular mediante la técnica de microscopía de fluorescencia como se observa a continuación en la Figura 49.





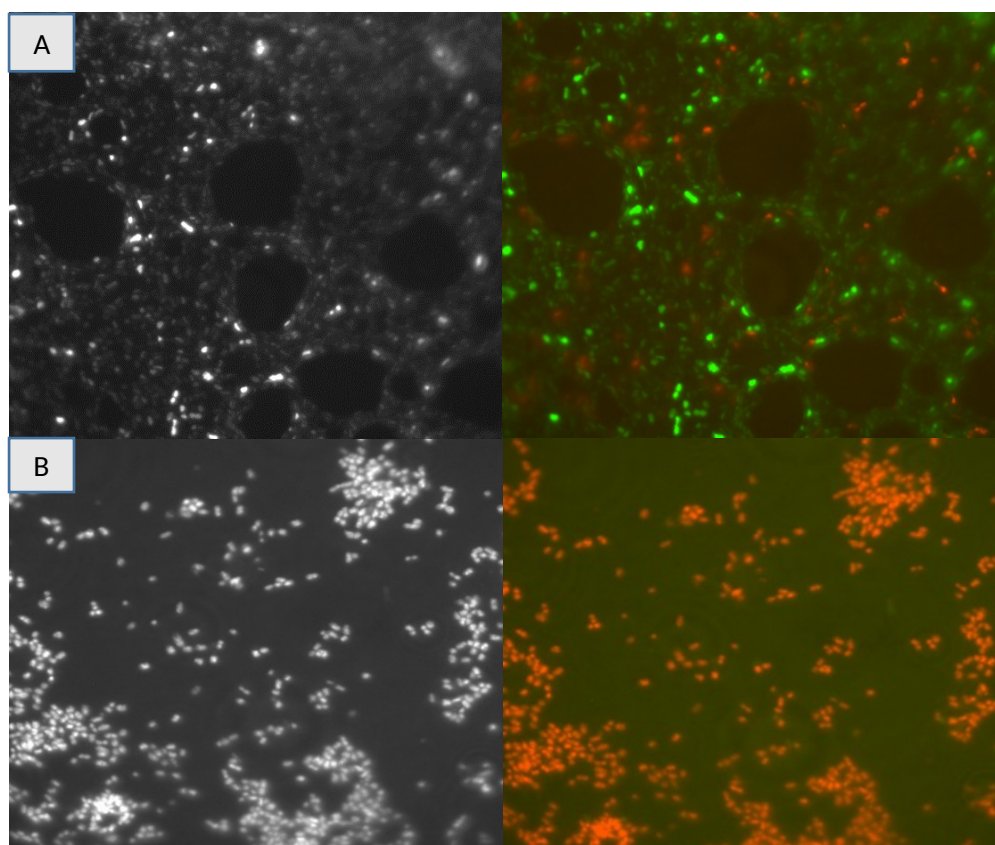
**Figura 49.** Prueba LIVE/DEAD con microscopia de fluorescencia (SEM) de las muestras del extracto de las semillas de *M. oleífera* funcionalizadas. Biofiltro inicial sin funcionalizar (A), Biofiltro funcionalizado en material filtrante usando grava a las 2 horas de tratamiento (B).

El tratamiento 4 estuvo conformado por los siguientes factores: tiempo de secado de 60 °C, aireación de 643 s/mL, concentración de 5%, salinidad de 1500  $\mu$ s/cm, TP de 0.86 mm y 2 horas de tiempo de lisis celular, el presente estudio obtuvo resultados similares que los realizados por Schulze-Makuch (2002), quién indicó que los materiales adsorbentes utilizados en sistemas de humedales como zeolita modificada con biosurfactantes presentaron procesos de adsorción entre 99-100% de *E. coli*, mientras que el material granular grueso con un tamaño de partícula (TP) de 5-25 mm inactiva entre 0.1-2.7 unidades logarítmicas de *E. coli*. Adicionalmente, se evidenció que entre más fino sea el material con un tamaño de partícula entre 2-13 mm, se puede alcanzar una inactivación bacteriana de 0.7 a 3.4 unidades logarítmicas de *E. coli*. Finalmente, estas condiciones alcanzaron los parámetros permisibles para utilizar el agua para consumo animal y para riego en los cultivos.

García et al. 2015 asoció la presencia de la *Pterigoespermina* como un compuesto similar al *4-ramnosil bencilisotiocianato* siendo el producto de la condensación de dos moléculas de bencilisotiocianato con una molécula de benzoquinona considerada con potente actividad antimicrobiana.

### 7.5.6. Ensayo de viabilidad bacteriana de LIVE / DEAD utilizando corcho como material filtrante

Se seleccionó el mejor tratamiento de un diseño experimental factorial fraccionado  $2^{7-4}$  del biofiltro funcionalizado con *MoSe*, para observar el efecto sobre la reducción de *E. coli*. Al realizar el análisis estadístico se obtuvo en el ANOVA, presentó diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ), donde el factor independiente que tuvo un efecto significativo fue la aireación. Adicionalmente, se observó un porcentaje mayor de reducción sobre 99.99% *E. coli* en los tratamientos (2, 6 y 4). Se seleccionó como aquella prueba considerada apta para la realización de la prueba dead/live para confirmar mediante la técnica de microscopía de fluorescencia la perturbación de membrana celular como se observa a continuación en la siguiente Figura 50.



**Figura 50.** Prueba live/dead con microscopía de fluorescencia (SEM) de las muestras del extracto de las semillas de *M. oleífera* funcionalizadas en corcho. Biofiltro inicial sin

---

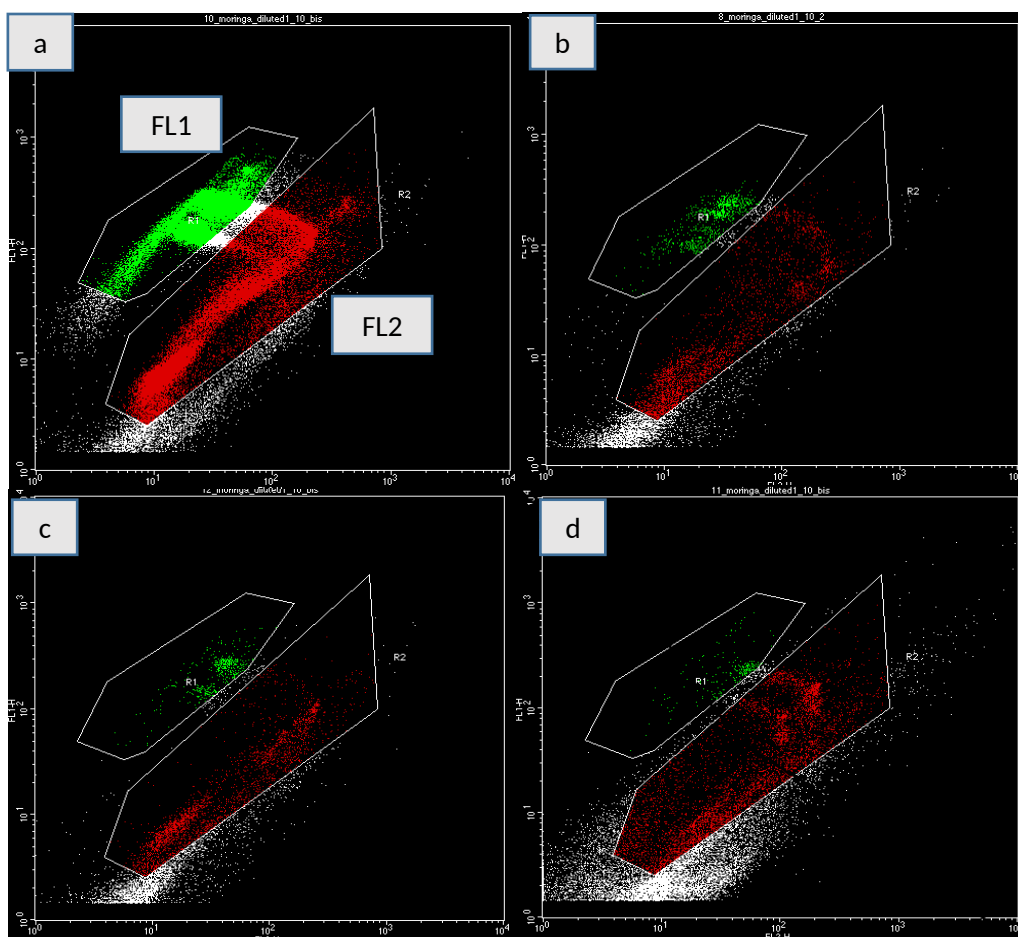
funcionalizar (A), Biofiltro funcionalizado en material filtrante de corcho a las 6 horas de tratamiento (B).

Se observó la tinción LIVE / DEAD de la cepa bacteriana para determinar el efecto de inhibición celular en el biofiltro funcionalizado con el corcho y *MoSe*. Se puede confirmar la diferencia entre el tratamiento control sin funcionalización sobre corcho y el efecto inhibitor sobre *E. coli* con un porcentaje de reducción de bacterias superior al 99,99%. El tratamiento 2 fue seleccionado para realizar la prueba LIVE / DEAD que consta de los siguientes factores: flujo de recirculación (7 mL / min), sin aireación (0 L/min), concentración del extracto de las semillas (5%), conductividad (1500  $\mu$ s / cm), Tiempo de retención hidráulica TRH (6 h), tamaño de partícula (TP) (5 mm) y tiempo de lisis LT (3 horas).

En el presente estudio se observó el mejoramiento de inhibición de *E. coli* al funcionalizar el material filtrante del corcho con *MoSe* presentándose como una posible resina que potencializa la actividad antimicrobiana junto con algunos componentes del corcho que generan posiblemente una sinergia y un mayor efecto de quimiosorción sobre la bacteria, obteniendo resultados similares a los realizados por Francesko et al. (2015) con notable inhibición bacteriana utilizando matrices orgánicas. Por otra parte, los estudios realizados por Xiong et al. (2017) funcionalizaron el extracto de semillas de *M. oleífera* en biofiltros con arena como material filtrante, evidenciando que la proteína catiónica presente en las semillas pudo ser adsorbida en la arena a través de la atracción electrostática permaneciendo la capacidad coagulante-floculante y la actividad antimicrobiana mejorando la remoción de patógenos y evitando la liberación de materia orgánica. Adicionalmente, se obtuvo una mejora con la arena funcionalizada en la eliminación de 3-4 log de partículas de 1  $\mu$ m, estas partículas de 1  $\mu$ m de tamaño fueron elegidos porque representan muchos contaminantes microbianos objetivo (como las bacterias coliformes) y la eficiencia del colector suele ser la más baja en este tamaño.

### 7.5.7. Citometría de flujo

A continuación, en las pruebas de citometría de flujo se observa la población de células bacterianas con una concentración inicial de  $10^5$  cel/mL, esta concentración bacteriana se sometió con el tratamiento 4 del diseño factorial fraccionado  $2^{7-4}$  con el corcho funcionalizado con *MoSe*. Se detectaron la fluorescencia de las muestras en los canales citométricos verde (FL1) y (naranja-rojo) (FL2, respectivamente. Un diagrama de puntos de fluorescencia verdes permitió la distinción del grupo de células "vivas" (es decir, células con membranas intactas y ADN presente) vs puntos de fluorescencia roja o grupos de células "muertas" (membranas comprometidas). Una gráfica de dispersión de ángulo recto vs la fluorescencia verde es útil para distinguir las células diferenciando entre los grupos "vivos" y "muertos" de la trama FL1-FL3 como se puede observar a continuación en la Figura 51.



**Figura 51.** Diagrama de dispersión de ángulo de las muestras del extracto de las semillas de *M. oleífera* funcionalizadas en corcho. Biofiltro inicial sin funcionalizar a las 6 horas (a), Biofiltro con corcho funcionalizado a las 6 horas de tratamiento (b). Réplicas del tratamiento (c) y (d).

La concentración celular de *E. coli* presentó mayor sensibilidad al tratamiento con el corcho funcionalizado con una concentración de extracto de la semilla de 10%. Este efecto posiblemente se pudo haber dado por procesos de adsorción generado por la proteína catiónica de las semillas que le otorgan esa propiedad sobre las bacterias obteniendo resultados similares a los realizados por Francesko et al. (2015). Adicionalmente, al comparar el presente estudio con las investigaciones realizadas por Varela et al. (2015) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos de las plantas para la inhibición de *E. coli*, indicando que hay varios mecanismos posibles por los cuales los compuestos fitoquímicos pueden producir un efecto antimicrobiano como: una posible alteración de las propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática, formación de poros, girasa de ADN e inhibición de la síntesis de ácido nucleico y toxicidad a través de formación de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, el efecto observado por los extractos en los microorganismos probados sugiere que podrían interferir directamente con la estructura de la membrana al crear poros, debido al tiempo requerido para producir la inhibición. Este mecanismo podría explicar muy bien las imágenes obtenidas por citometría de flujo, donde se necesita la permeabilidad de la membrana celular para que el yoduro de propidio (PI) ingrese a la célula y se adhiera al ADN, lo que indica que los microorganismos están comprometidos (Varela et al. 2015).

## **7.6. Evaluación del efecto del extracto de la semilla de *M. oleífera* en la remoción de endosulfán**

### **7.6.1. Caracterización morfológica de *P. putida***



*P. putida* es una bacteria Gram negativa en forma de bacilos, esta cepa es aislada a un medio selectivo (agar cetrimide) para el aislamiento de *P. aeruginosa* y de otras especies de este género, estimulando la formación de pigmentos ya que en la formulación del medio el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de pirocianina, pioverdina, piomelanina y fluorescencia. Adicionalmente, la ceftriaxona actúa como agente inhibidor para la microbiota acompañante, al realizar el aislamiento en este medio se observó un crecimiento de colonias pequeñas, circulares, con elevación convexa y presencia de pigmentación fluorescente y al realizar la tinción de Gram, se observaron bacilos cortos curvados Gram negativos (Fernández et al. 2009); confirmándose así la presencia de este microorganismo como se observa en la Figura 52.

Descripción Macroscópica	Descripción Microscópica
 <p data-bbox="256 1314 781 1507">Colonias medianas, circulares, con elevación convexa, con presencia de fluorescencia; medio de cultivo agar Cetrimide.</p>	 <p data-bbox="829 1362 1377 1451">Bacilos cortos curvos, Gram negativos no esporulados.</p>

**Figura 52** Caracterización macroscópica y microscopia de *P. putida*.

### Identificación molecular de *Pseudomonas putida*

Inicialmente, se obtuvo la secuencia del fragmento ribosómico 16S de *P. putida* con un total de 1446 como se puede observar en la figura 53. Se realizó la

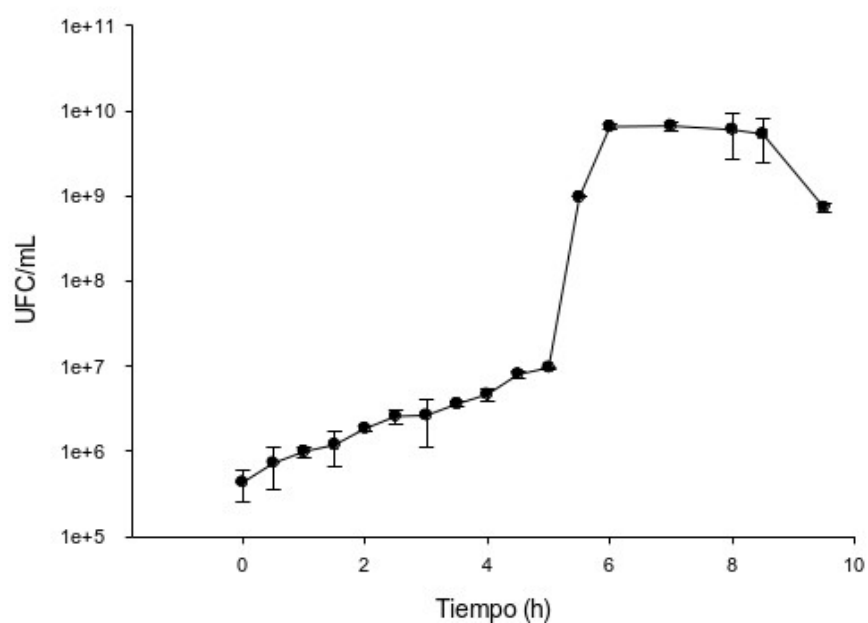
identificación molecular mediante La secuencia más similar según la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Según el análisis molecular de la secuencia del fragmento ribosómico 16S de la cepa con 100% de similitud con la secuencia de la especie *Pseudomonas putida* cepa NBRC 12668 (Nº de acceso: AB680312.1). Este tipo de microorganismo capaz de degradar compuestos xenobióticos también fue estudiado por Sunitha et al. 2012, en el cual caracterizaron y encontraron a *P. putida* KS-2P e ITR01 indicando que estas cepas eran capaces de degradar el sulfato de endosulfán con un valor del 70% y la ventaja de utilizar esta bacteria se debe a su no patogenicidad. Por lo tanto, podría ser un candidato ideal para su uso en estudios de biorremediación donde este organismo puede introducirse en el medio ambiente sin problemas de toxicidad.

```
ACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTGAGCGGCGGACG
GGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGT
CCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACAC
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC
GTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTG
TTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCC
TTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAGTCAA
ATGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAG
GCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCA
CGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCT
AATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
CGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGT
TGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGA
```

**Figura 53.** Secuencia más similar de acuerdo a la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con su base de datos de secuencias del fragmento 16S ribosomal de cepas tipo.

### 7.6.2. Curva de crecimiento de *P. putida*

A continuación, en la Figura 54 se aprecia la curva de crecimiento de *P. putida* durante un tiempo de 10 h en medio mineral, pH 7 a una temperatura de 37 °C donde la fase de crecimiento celular inició a las 5 horas con una concentración de  $4.2 \times 10^6$  UFC/mL y la fase exponencial máxima se observó a las 6 h con una concentración celular de  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL.



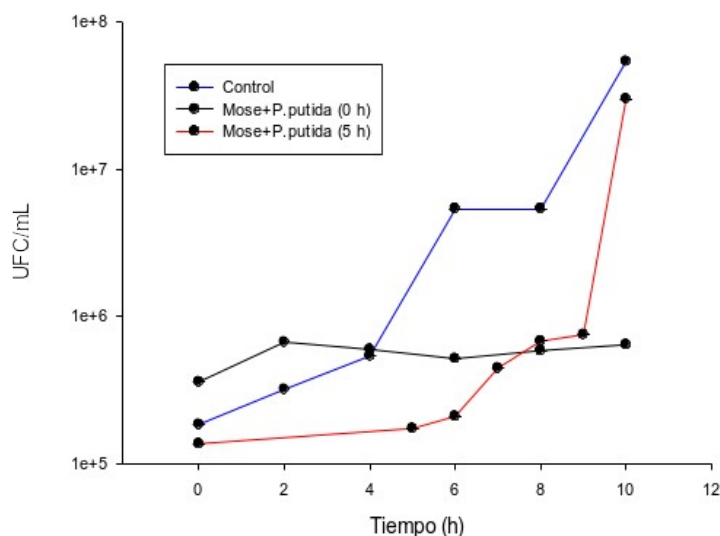
**Figura 54.** Cinética de crecimiento de *P. putida*.

### 7.6.3. Cinética *P. putida* vs el extracto de semillas de *M. oleifera*

El efecto que se observó en las primeras horas de la cinética fue que el microorganismo no presentó un incremento significativo en su duplicación celular, manteniéndose en la misma concentración de  $1.0 \times 10^5$  UFC/ml, indicando que

*M. oleifera* posiblemente estaba inhibiendo su crecimiento celular. Esto puede deberse a su actividad antimicrobiana ya que contiene taninos, alcaloides, saponinas, fenoles y flavonoides, compuestos comunes en la fabricación de diversos antibióticos utilizados para el control de cepas patógenas. Adicionalmente, los extractos de semillas de se ha demostrado que son efectivos tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, su acción bacteriostática consiste principalmente en la disrupción de la membrana celular por inhibición de enzimas esenciales y su efecto bactericida es producido por la acción de 4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocionato de bencilo (C et al. 2013).

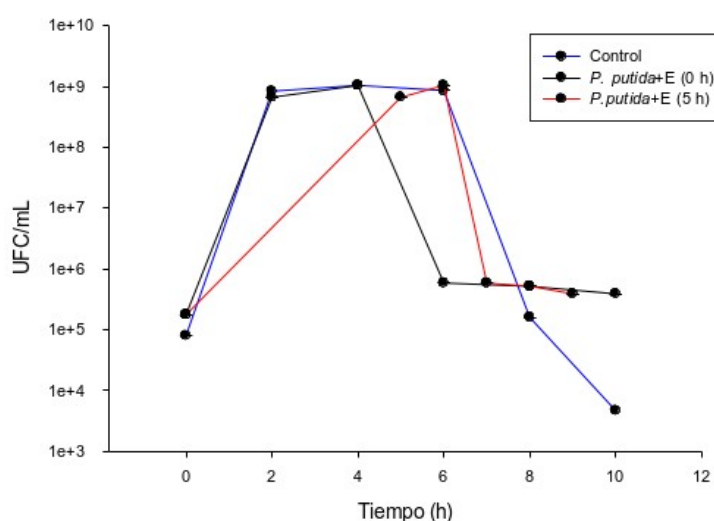
Así mismo, cuando el extracto de las semillas es adicionado antes de su fase exponencial, se evidenció un incremento en su concentración celular con un valor de  $1.0 \times 10^7$  UFC/mL, esto se debe a que el microorganismo contiene la concentración bacteriana suficiente para utilizar una fuente de carbono como es glucosa que contiene el extracto de las semillas de *M. oleifera* (Saa et al. 2019). Esté crecimiento celular fue similar al presentado por el control como se observa en la figura 55.



**Figura 55.** Cinética de *Moringa oleifera* y *P. putida*

#### 7.6.4. Cinética *P. putida* Vs Endosulfán

En el presente estudio, la presencia de endosulfán aumentó el crecimiento de *P. putida* ( $10^9$  UFC/mL) durante la incubación en medio modificado con endosulfán se confirmó aumentando el número creciente de células bacterianas (Figura 56). Esto puede deberse a que la cepa de *P. putida* toleró una concentración de 1mg/L de endosulfán y utiliza este plaguicida como única fuente de carbono con una posible biodegradación de este compuesto. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Mir et al. 2017, quién utilizó una cepa de *P. putida* (ZAM1) fue altamente eficiente degradando la concentración máxima de endosulfán en un período de incubación muy corto (in vitro), en comparación con estudios previos que informaron las cepas bacterianas para la degradación del endosulfán, que utilizaron compuestos de carbono y azufre como agentes de transferencia de electrones (Awasthi et al.2003).

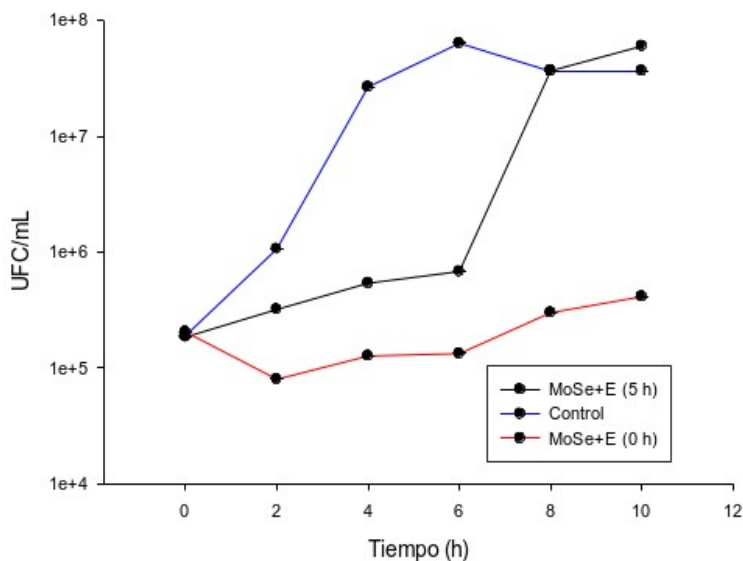


**Figura 56.** Cinética de *P. putida* en presencia de Endosulfán adicionando en el tiempo de 0 y 5 horas.

#### 7.6.5. Cinética *P. putida* vs extractos de *Moringa oleifera* y endosulfán

Se evaluó el efecto de MoSe y endosulfán agregándolos juntos en el crecimiento bacteriano de *P. putida*; como se observa en la Figura 57, al agregar estos dos

componentes como suplementos de la fuente de carbono, el microorganismo inicialmente se encuentra en un estado de latencia, pero a las 5 h, se observó un aumento en su crecimiento celular, lo cual indica que la concentración inicial no es capaz de implementar a *Moringa* o al plaguicida como fuente de carbono y la población bacteriana es inhibida. En contraste, cuando son adicionados antes de iniciar su fase exponencial, se ve que el microorganismo presenta un incremento de sus unidades celulares, mayor que las del control, lo cual indica que implementó al endosulfán como fuente de carbono; esto puede deberse por la producción de biosurfactantes (Bhatt et al. 2021).

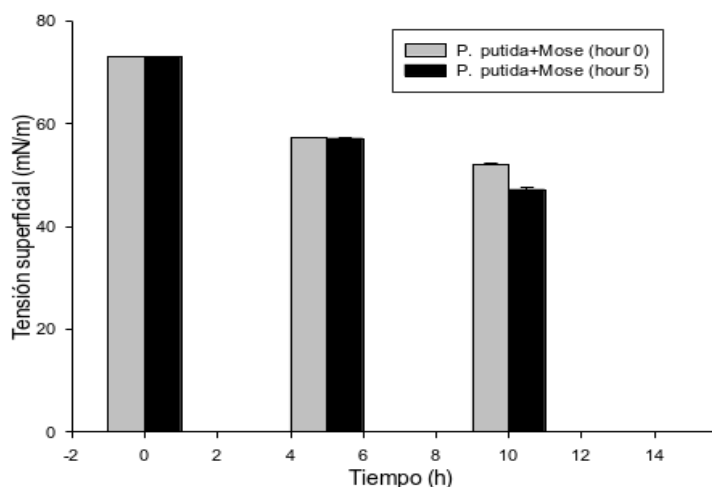


**Figura 57.** Cinética de *P. putida* en presencia de Endosulfán y extracto de *M. oleifera* adicionado en el tiempo 0 y 5 horas respectivamente.

#### 7.6.6. Tensión superficial

En este estudio, todos los tratamientos mostraron una disminución de la tensión superficial (Figura 58). Sin embargo, el tratamiento con combinación de extracto de *M. oleifera* y endosulfán presentó la mayor disminución de la tensión superficial disminuyendo de 70 mN·m<sup>-1</sup> a 48,33 mN·m<sup>-1</sup>, *Moringa oleifera* presentó la capacidad de disminuir la tensión superficial, debido a la presencia de saponinas

presentes en las semillas, produciendo una espuma estable (Olson y Fahey, 2011). Adicionalmente, *P. putida* por su capacidad de producción de biosurfactantes (lipopéptidos, ramnolípidos, soforolípidos y glicéridos) también tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial (Bhatt et al. 2021).

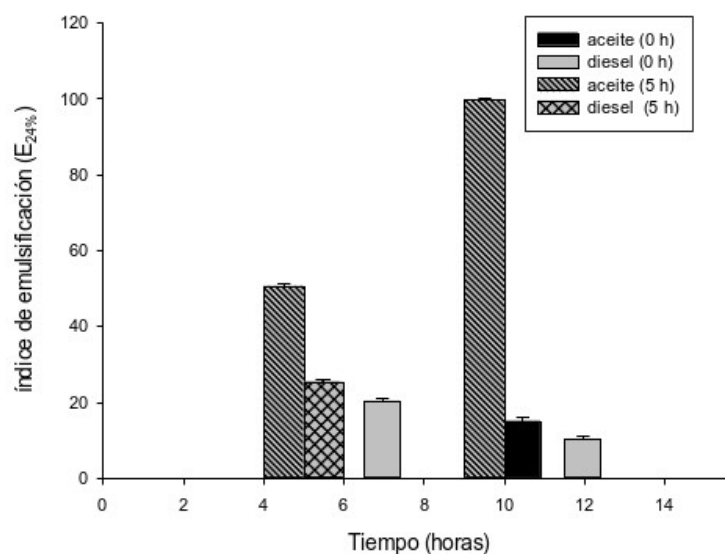


**Figura 58.** Disminución de la tensión superficial en presencia del extracto de *M. oleífera* y *P. putida*

### 7.6.7. Índice de Emulsificación

En este estudio, *P. putida* presentó la capacidad de producir un agente biotensivo, de acuerdo con el índice de emulsificación, este presentó más similitud con el aceite vegetal que el diesel. Adicionalmente, el índice de emulsificación fue mayor en presencia de *M. oleífera* en comparación que con el endosulfán, Figura 59. El aumento del agente biotensivo se evidenció cuando los extractos se agregaron al inicio de la fase exponencial indicando que el microorganismo secretaba este componente para solubilizar los nutrientes o fuentes y permiten su biodisponibilidad como posible fuente de carbono o como medida de protección (Burgos 2012). Los estudios han demostrado que un factor importante en la producción de biosurfactantes por *P. putida* es la fuente de nitrógeno, según Tiso et al. (2020), indicó que la cantidad absoluta de nitrógeno influyó en el rendimiento

óptimo de biomasa, mientras que la concentración de la fuente de carbono determina la conversión del carbono disponible en biosurfactante. En este sentido, *M. oleifera* presenta 9 aminoácidos esenciales: prolina, cistina, isoleucina, metionina, lisina, triptófano, tirosina, arginina, treonina y fenilalanina que podrían servir como fuente de nitrógeno para el crecimiento de *P. putida*.

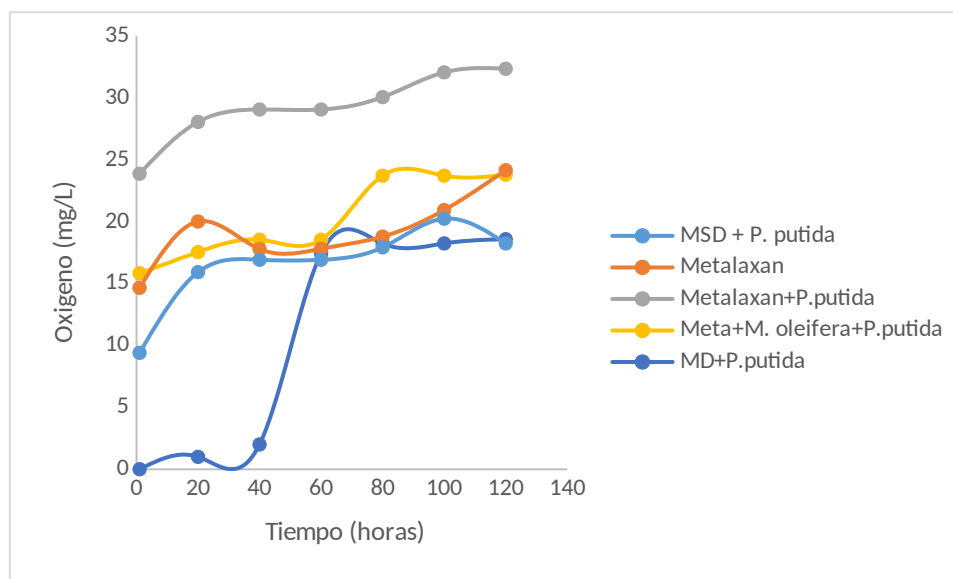


**Figura 59.** Índice de emulsificación de los tratamientos evaluados.

### 7.7. Prueba de biodegradabilidad de plaguicidas mediante respirometría electrolítica

En esta sección se evaluó el ensayo de biodegradabilidad y se determinó la capacidad de *P. putida* para degradar metalaxyl que se caracteriza por ser un fúngicida que se encuentra en altas concentraciones en las aguas residuales de Cataluña, España. A continuación, en la Figura 60, se observan las cinéticas de biodegradabilidad mediante un respirómetro electrolítico que determina la concentración de oxígeno acumulado del microorganismo capaz de asimilar el plaguicida como única fuente de carbono a una concentración de 1 mg/L.



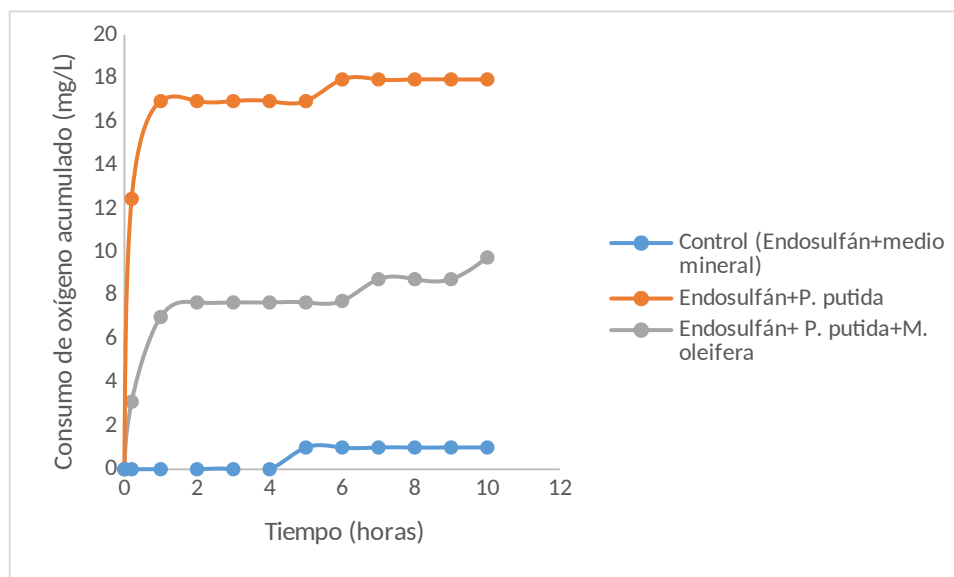


**Figura 60.** Biodegradabilidad de metalaxyl por *P. putida*. MSD (medio mineral sin dextrosa), MD (medio mineral con dextrosa).

Inicialmente, se evidenció que el consumo de oxígeno acumulado fue duplicado por la cinética de la prueba de Metalaxyl con *P. putida* que el medio mineral con el microorganismo alcanzando valores de 33 y 16 mg/L, respectivamente. Estos resultados de biodegradabilidad del metalaxyl pueden ser sustentados con los estudios realizados por Bailey et al. (1986) donde realizaron ensayos de biodegradabilidad de metalaxyl con microorganismos como *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas delajieldii*, *Bacillus cereus* y *Corynebacterium* sp., identificadas como bacterias con capacidad de degradar metalaxyl a las 24 horas liberando los siguientes productos (alanina metiléster), resto acilo (metoxiacetilo) o resto arilo (2,6-La sustitución con dimetilo), explicando la actividad de biodegradar es posible mediante las enzimas microbianas (anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa y *p*-amilasa). Adicionalmente, demostró que las acilamididasas actúan sobre los grupos amina. Con respecto al ensayo donde se utilizó el extracto de las semillas de *M. oleifera*, metalaxyl y *P. putida* se observó a las 130 horas un consumo de oxígeno disuelto de 22 mg/L. Estos resultados pueden presentarse ya que *M. oleifera* además de actuar como coagulante natural puede servir como un medio de soporte para que los microorganismos tengan mayor

facilidad en la asimilación en compuestos de difícil biodegradabilidad, igualmente cumple la función de fuente nutricional alterna para su crecimiento, presentando altos contenidos en la fuente de nitrógeno y se sugiere que puede haber un proceso de cometabolismo involucrado en el crecimiento del microorganismo en presencia del plaguicida y *M. oleifera* (Varjani et al. 2017).

Por otra parte, se evidenció que el consumo de oxígeno acumulado fue duplicado por la cinética de la prueba de Endosulfan con *P. putida* que el medio mineral con el microorganismo alcanzando valores de 18 y 1 mg/L, respectivamente (Figura 61). Estos resultados de biodegradabilidad de Endosulfan pueden ser sustentados con los estudios por Blank et al. (2010), donde indicó que *P. putida* ofrece una gran cantidad de cofactores especialmente para las oxidorreductasas y presenta un metabolismo versátil con diversas capacidades enzimáticas intrínsecas para fines de producción (Nelson et al. 2002; Tiso et al. 2014

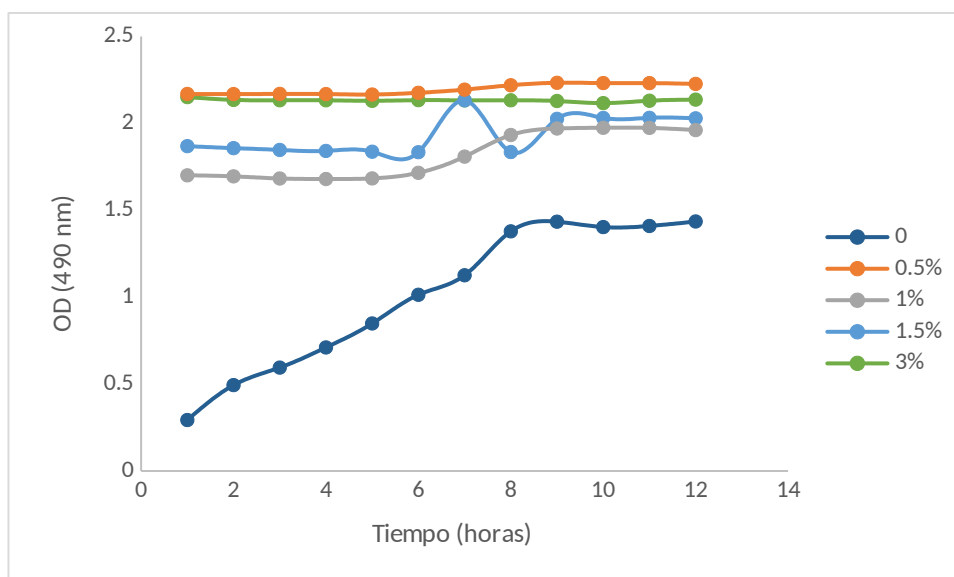


**Figura 61.** Biodegradabilidad de endosulfan por *P. putida*. MSD (medio mineral sin dextrosa), MD (medio mineral con dextrosa).

Mientras que, al mismo tiempo, "simplifica la detección de muchos metabolitos sintetizados heterólogos" especialmente adecuado para procesos de producción en sistema de dos fases (Heipieper et al. 2007). Es decir, la cepa bacteriana es

capaz de adaptarse a condiciones complejas por lo cual empieza a expresar cambios en sus genes de resistencia. Así mismo, se observó que la bacteria es capaz de crecer con *M. oleifera* con un consumo de oxígeno acumulado de 8 mg/L, aunque el microorganismo es capaz de crecer aún se observa menor resistencia y consumo del plaguicida con el extracto de la semilla, sin embargo, su adaptación dura mayor tiempo para iniciar su fase logarítmica, esto puede deberse a que el microorganismo está siendo inhibido por la propiedad antimicrobiana que presentan los compuestos fitoquímicos de la semilla. (Adewale et al. 2021)

Con respecto a la prueba donde se evaluó diferentes concentraciones de endosulfan como se observa en la Figura 62. Se evidenció que la bacteria exhibió una alta tolerancia al plaguicida hasta una concentración del 1.5%. Esta característica es el resultado de adaptaciones complejas, tales como sistemas de eflujo efectivos que normalmente se activan en presencia de xenobióticos (Basler et al. 2018), la adaptación observada puede ser sustentada con los estudios realizados por Helpieper et al. (2007) donde explica que la adaptación "se define como un cambio en la fisiología celular y /o composición para adaptarse al entorno con modificaciones genéticas (mutaciones). Así mismo, también el autor exhibe algunos mecanismos permitiendo que las bacterias sobrevivan concentraciones tóxicas de compuestos orgánicos como: Rigidificación de la membrana celular, el cambio en el contenido/composición de proteínas de la membrana, excreción activa del disolvente, adaptación del estado energético, cambios en la composición de la pared celular y la membrana externa, cambios morfológicos y transformación del compuesto orgánico.



**Figura 62.** Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Endosulfan sobre *P. putida* con densidad óptica (OD) utilizando la técnica turbidimétrica del TECAN.

## 7.8. Aplicación Biotecnológica

Inicialmente se realizó un seguimiento de la caracterización fisicoquímica y biológica del canal y biofiltros del agua a tratar, después del montaje del sistema, éste fue monitoreado en diciembre del 2019 con el inicio del invierno y se realizó un seguimiento tres meses después en marzo, al inicio de la primavera del presente año 2020. A continuación, en la Tabla 36, se observa la caracterización del agua del canal y de los biofiltros en la chinampa Aurora.

**Tabla 36.** Evaluación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la Chinampa Aurora.

Parámetro	Agua del canal Agosto 2018	Biofiltro 1	Bofiltro 2 Agosto 2018	Bifoiltro 2 Dciembre 2019	Agua de canal Marzo 2020	Biofitlro 2 Marzo 2020	Límites permisibles
pH	7.4	7.5	7.62	8.06	7.79	7.66	7-8
OD ( $\frac{mg}{L}$ )	4.60	15.68	8.79	5.33	0.85	3.01	>6
Conductivi dad ( $\frac{\mu S}{cm}$ )	935	894	920	2237	1115	1191	0-300
ST ( $\frac{mg}{L}$ )	565	665	1145	...	...	....	<1000
SDT ( $\frac{mg}{L}$ )	467	947	1985	1245	567	570	<1000
SST ( $\frac{mg}{L}$ )	42.5	25	85	...	--	...	75-125
DQO ( $\frac{mg}{L}$ )	183.3	166.68	164.3	...	---	....	30
Coliformes fecales (UFC/mL)	4x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>1</sup>	2.5x10 <sup>1</sup>	1.5x10 <sup>1</sup>	1x10 <sup>2</sup> Ausencia

Límites permisibles para uso en riego agrícola de acuerdo a la norma (NOM-001-SEMARNAT-1996)

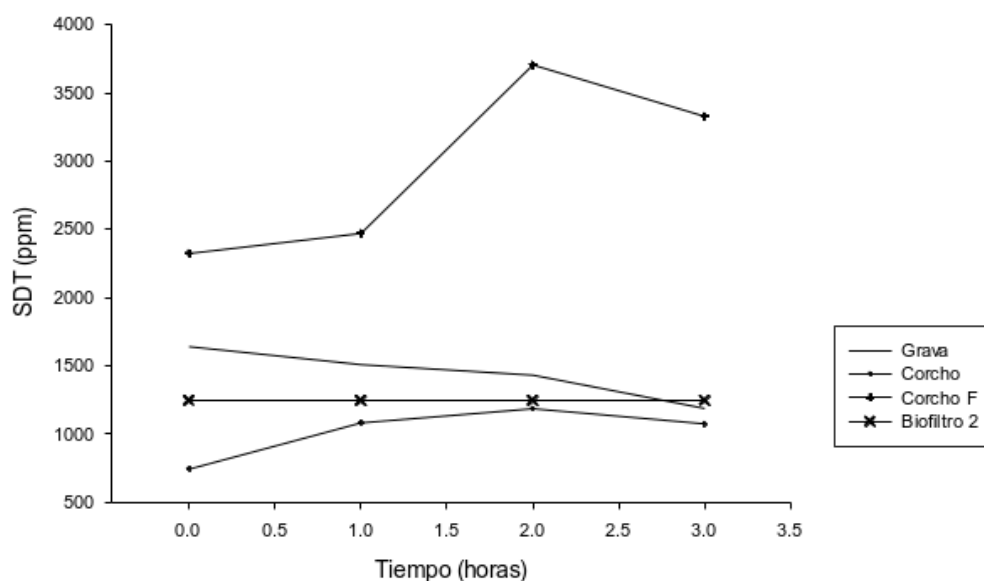
### 7.8.1. Seguimiento del funcionamiento del sistema hidropónico

El sistema fue construido y monitoreado en diciembre del 2019 con el inicio del invierno y se realizaron 2 tomas de muestras tres meses después en marzo, al inicio de la primavera del presente año 2020, teniendo en cuenta que se agregaba agua recolectada del tratamiento del biofiltro secundario para abastecer el Sistema NFT.

Para el seguimiento se realizó una cinética del comportamiento de los filtros durante un tiempo de 4 horas (0, 1, 2, 3 y 4 horas) para evaluar el comportamiento

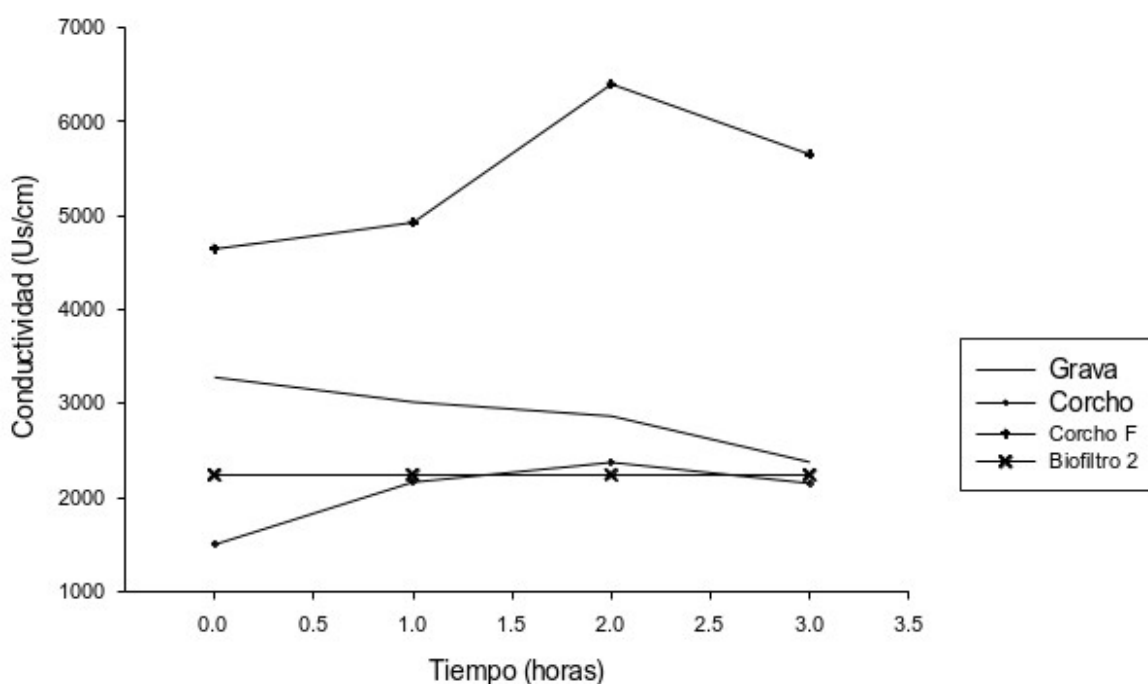
de los parámetros fisicoquímicos. Al observar el efecto del sistema sobre los sólidos disueltos como se observa en la Figura 63, los valores que tienden a aumentar dentro de las 3 primeras horas provienen del material geotextil filtrante del corcho funcionalizado con *MoSe* mientras que los valores permanecían constantes entre 600 y 1600 con grava y corcho, respectivamente.

Los valores de sólidos disueltos totales presentados en el agua del biofiltro fueron los únicos que permanecieron constantes. Este comportamiento puede deberse a la liberación de componentes del corcho como son los compuestos fenólicos donde los estudios realizados por Beltrán de Beltrán de Heredia et al. (2004) reportaron que son los posibles responsables del ensuciamiento de la membrana y así la producción de mayor SDT, DQO, DBO, color y olor. Por lo que se sugiere un tratamiento previo para evitar la liberación y el ensuciamiento del agua. Así mismo, la liberación de componentes poli fenólicos pueden inducir a la inhibición de microorganismos patógenos (Gonçalves et al. 2012).



**Figura 63.** Efecto de los sólidos disueltos totales en el sistema NFT.

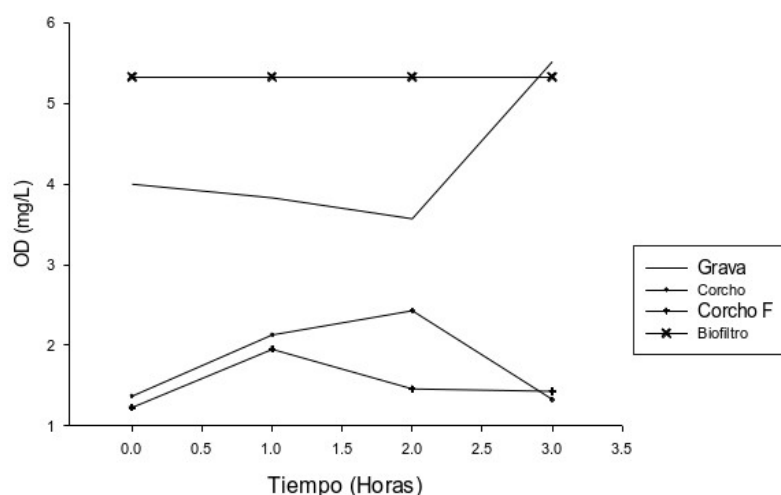
Por otra parte, se evaluó el efecto de los filtros con el material de grava y de corcho sobre la conductividad como se observa en la Figura 64, donde se evidenció que el corcho funcionalizado con el extracto de las semillas de *M. oleifera* presentó altos valores a diferencia del corcho sin funcionalizar, grava y el agua del biofiltro, esto puede deberse ya que en el proceso de la funcionalización se utiliza en la solución de las semillas concentraciones de NaOH (1%) para la solubilización y la extracción de la proteína catiónica de bajo peso molecular con actividad coagulante y antimicrobiana (Okuda et al. 1999; Madrona et al. 2010). Sin embargo, se evidencia que al transcurrir el tiempo de 3 horas comienza a disminuir de nuevo los valores de conductividad.



**Figura 64.** Efecto de la conductividad en el sistema NFT.

Adicionalmente, en la Figura 65, se observó el efecto del biofiltro sobre el parámetro de oxígeno disuelto con valores muy constantes de 5.2 mg/L a diferencia del sistema filtrado con corcho que tiende a disminuir la concentración de oxígeno del agua entre 1 y 2 mg/L. Estos resultados son consistentes y similares con el estudio realizado por Xu et al. (2012), donde utilizó un filtro de

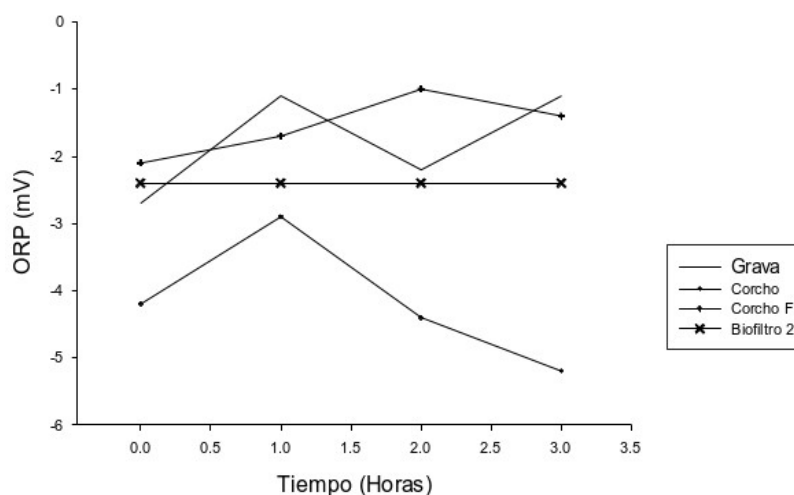
arena para el tratamiento de aguas residuales y redujo el valor de oxígeno disuelto al valor similar del presente estudio, esta disminución de la concentración puede deberse a los estudios realizados por Lequin et al. (2012) donde explica la leyes de trayectoria de las especies difusoras de oxígeno es mayor que el diámetro de poro de corcho, por lo tanto, significa que las moléculas chocan principalmente con la pared del material impidiendo la cinética de transferencia y disminuyendo la concentración de oxígeno.



**Figura 65.** Efecto del sistema NFT sobre el oxígeno disuelto.

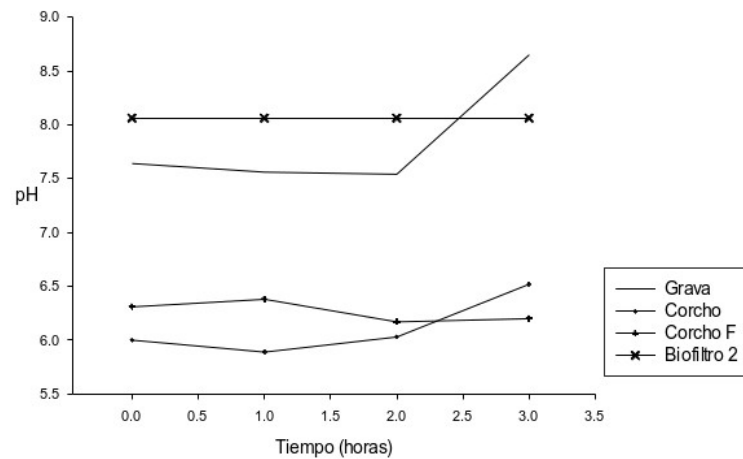
Así mismo, el sistema evidenció cambios en el indicador de óxido-reducción (Figura 66), donde todos los valores estaban por debajo de cero de los tratamientos indicando que el influente puede presentar procesos reductivos concurriendo a reacciones de desnitrificación donde ocurre la reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) y puede desarrollarse por bacterias desnitrificantes con valores de ORP entre +50 to -50 mV. Adicionalmente, el aumento de valores de ORP que presentó el tratamiento con el corcho funcionalizado con el extracto de *M. oleifera* puede deberse a la generación de especies reactivas de oxígeno dentro de los componentes biológicos de las semillas como compuestos polifenólicos.





**Figura 66.** Efecto Redox en el sistema.

Finalmente, se observó el efecto del sistema sobre el indicador de pH (Figura 67), donde se obtuvo un pH de la muestra de agua del biofiltro con un valor constante de 8 durante las 3 horas, en la sección de filtración con material de la grava tendió a aumentar el pH después de las 2 horas con valores de 7.5 a 8, mientras que el corcho y el corcho funcionalizado con *MoSe* se mantuvo el pH entre 6.0 y 6.5, respectivamente. Este indicador es importante ya que influye en la disponibilidad de nutrientes y el pH de la solución para absorción de la planta en el sistema hidropónico. Por ejemplo, un mayor nivel de pH en solución nutritiva puede limitar la eficiencia de absorción de la planta de ciertos elementos esenciales, como nitrógeno, fósforo, calcio y hierro, ya que están limitados en las soluciones de sistemas hidropónicos de aguas residuales (Rackoy et al. 2006). La solución nutritiva También se informa que el pH está influenciado por los numerosos factores, que incluyen, calidad del agua (alcalinidad), incorporación de compuestos minerales y orgánicos, especies de plantas, forma de nitrógeno, concentración de nutrientes y catión. Se sabe que la capacidad de intercambio del sustrato influye en El pH de una solución nutritiva en el sistema hidropónico (Mekuto et al. 2016).



**Figura 67.** Efecto del pH en el sistema hidropónico.

### 7.8.2. Estado del Sistema después de 3 meses

A continuación, se observa el estado del sistema hidropónico NFT el mes de marzo, donde se encontró el sistema físico (material) en buenas condiciones, el agua del biofiltro secundario a tratar con material vegetal en su superficie, como se observa en la siguiente Figura 68. Así mismo, se retiraron las plantas de lechuga del sistema evidenciando su bajo rendimiento en el crecimiento foliar.



**Figura 68.** Sistema hidropónico NFT (a); Biofiltro secundario (b).

La recolección de las plantas se realizó según la densidad y longitud de las raíces, donde se observó que, en la etapa inicial del sistema de filtración, en la captación inicial, la abundancia de la raíz fue la mayor y al finalizar el sistema, aquellas plantas que se observan con una baja densidad de raíces, fueron las que se encontraron ubicados en la mitad del sistema como se observa en la siguiente Figura 69.

Se pesaron las plantas completas, así como las raíces, esponja fenólica y las hojas, en comparación con los cultivos convencionales cultivados en suelo de la chinampa, la calidad del vegetal en cuanto a su tamaño, cantidad de hojas y color convencional fue muy distinto a los cultivos del sistema hidropónico, observándose particularmente que en estas plantas su crecimiento y longitud de raíces fueron más grandes, este tipo de crecimiento de la planta pudo deberse en términos de crecimiento y nutrientes la absorción de nutrientes de las plantas de lechuga tratadas con aguas residuales como se desempeñaron mal y este resultado es consistente con los estudios de Da Silva Cuba Carvalho et al. (2018), quien confirmó el efecto negativo de falta de nutrientes en el crecimiento de las plantas, lo que demuestra que las aguas residuales sin suplementación de nutrientes no es factible para su uso en hidroponía de cultivo de lechuga. Sin embargo, la mejor absorción de nutrientes de la lechuga cultivada hidropónicamente usando aguas residuales para riego demostró un resultado deseable en términos de tratamiento y purificación de aguas residuales.



**Figura 69.** Estado de las plantas, Sección inicial del sistema con alta abundancia de raíces (a); Sección media del sistema con escasas raíces (b).

Adicionalmente, se realizaron los análisis fisicoquímicos de las muestras de agua tratada de cada parte del sistema hidropónico, observándose principalmente que el sistema favorece en la reducción de *E. coli* como se observa en la Tabla 37. Así mismo, tiende a mejorar la estabilidad del pH con el corcho que es un indicador que influye en la absorción de los nutrientes en el cultivo a diferencia del sistema de filtración de la grava donde se observa un incremento en los sólidos disueltos totales, esto puede deberse que en este tiempo de uso de 3 meses la roca empieza a desprender y a liberar componentes minerales que causan la elevación de sales en el sistema por lo tanto la elevación del pH a valor de 9.11 y la conductividad es mayor a la del agua del canal, la grava fue el material que evidenció más desgaste en el sistema de filtración.

**Tabla 37.** Medición de parámetros fisicoquímicos después de 3 meses de funcionamiento del sistema

Muestra	pH	ORP	OD (%)	OD (mg/L)	CE ( $\frac{\mu S}{cm}$ )	SDT ppm	<i>E. coli</i> (UFC/mL)
Agua canal	7.79	266.9	13.3	0.85	1115	567	$2.5 \times 10^1$
Biofiltro	7.66	268.8	44.6	3.01	1191	570	$1 \times 10^1$
Grava	9.11	166.3	42.2	2.87	2708	1354	$3 \times 10^1$
Corcho	7.28	152	22.3	1.86	1832	916	$< 10^1$
Corcho F	7.6	149	26.75	1.87	1972	986	$< 10^1$

Por otra parte, se realizaron los análisis microbiológicos tanto de cada tratamiento del sistema hidropónico como del cultivo de lechuga de aquellas plantas que se observaban con mayor densidad de raíz y menor en el sistema de filtración de grava, a continuación, en la Tabla 38 se observa la cuantificación de *E. coli* en las lechugas hidropónicas.

**Tabla 38.** Cuantificación de *E. coli* en cultivo de lechuga del sistema hidropónico

<i>Latucca Sativa</i>		<i>E. coli</i>					
		Raíz		Hojas		Esponja Fenólica	
Muestra	Peso total (g)	LB	EMB	LB	EMB	LB	EMB
1	9.9	36x10 <sup>2</sup>	<10 <sup>1</sup>	21.66x10 <sup>2</sup>	<10 <sup>1</sup>	50x10 <sup>2</sup>	30
2	5.7	20x10 <sup>2</sup>	<10 <sup>1</sup>	36x10 <sup>1</sup>	6x10 <sup>1</sup>	24x10 <sup>2</sup>	20
3	3.1	17x10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>	25x10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>	21x10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>
4	4.5	13x10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>	50 x10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>	32x10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>

Finalmente, se realizaron los análisis microbiológicos de las plantas seleccionadas, cuantificando *E. coli* en la raíz, hojas y esponja fenólica, observándose que en la planta donde iniciaba el sistema de filtración con grava presentaba mayor densidad y abundancia de raíz como su longitud a diferencia de las otras plantas, evidenciándose una alta inhibición de *E. coli* en el medio confirmativo (Eosina azul de metileno) EMB en las las raíces a diferencia de las bacterias cultivadas en el medio Luria-Bertani LB, siendo uno de los más usados para el cultivo de *E. coli* y otras especies bacterianas, debido a que es rico en nutrientes principalmente de triptona que es el producto de la digestión de la caseína proveniente de la leche con enzimas pancreáticas, así que todas aquellas bacterias fermentadoras de lactosa crecieron en este medio, estos resultados son consistentes con los estudios realizados por (Ottoson et al. 2005) donde informaron la inhibición de microorganismos patógenos en el sistema radicular por procesos de absorción y adsorción de la planta contribuyendo a la eliminación microbiana en el sistema. Así mismo, de las 4 muestras se observó solamente crecimiento de *E. coli* con un valor de  $6 \times 10^1$  ufc/mL en medio EMB con la planta número 2 y en la esponja fenólica fue donde se evidenció más cantidad de *E. coli* en la muestra 1 y 2 a diferencia de la muestra 3 y 4 plantas con menor tamaño y densidad de raíces en el cual no se observó crecimiento de *E. coli*. El proceso de eliminación de microorganismos patógenos implica una serie de mecanismos,

como la filtración, que es proporcionada por la grava donde se eliminan los microorganismos y a través de la antibiosis, un proceso donde los microorganismos interactúan entre sí biológicamente resultando en la reducción de su población (Martin et al. 2013). La capacidad del sistema hidropónico para la eliminación de patógenos en aguas residuales presentó la eliminación de coliformes fecales. Además, la capacidad del sistema de tratamiento de aguas residuales hidropónicas para la eliminación de microorganismos fue examinada por Ottoson et al. (2005) su estudio incluyó el análisis de muestras no tratadas, en aguas residuales tratadas y no tratadas para indicadores microbianos fecales (Coliformes, *E. coli*, esporas de *Clostridium perfringens* y colifagos somáticos).

## 8. CONCLUSIONES

- El extracto de las semillas de *M. oleifera* presentó propiedades de un agente de superficente, que por su naturaleza se denomina biosurfactante. En cuanto a la disminución de la tensión superficial y capacidad emulsificante, las variables que presentaron un mayor efecto sobre la  $\Delta TS$  fueron: Menor tamaño de partícula (0.86mm), menor CMC (700 mg/L), menor tiempo de contacto (20 min) y pH alto (8.5). Así mismo, las variables que presentaron efecto sobre la  $E_{24}$  fueron: mayor CMC (1500 mg/L), menor conductividad (1500  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), mayor pH (8.5). Adicionalmente, se observó una correlación ( $p = 0,0018$ ;  $R^2 = -0,668$ ) entre  $E_{24}$  y la inhibición de *E. coli* donde la CMC más baja del extracto de *M. oleifera* disminuyó la  $\Delta TS$  y mejoró la inhibición bacteriana en contraste con E24.
- Se determinó que las saponinas se encuentran dentro de los compuestos fitoquímicos presentes en el MoSe que tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli*, mediante la extracción con etanol.
- El extracto de *M. oleifera* presentó la capacidad de inhibir a *E. coli* en un 99.96% y la concentración mínima inhibitoria que presentó efecto de actividad antimicrobiana sobre *E. coli* fue del 20%. Adicionalmente, el extracto de las semillas de *M. oleifera* inhibió el crecimiento de *S. epidermis* con una concentración de 10% mientras que *P. aeruginosa* y *C. albicans* fueron inhibidas hasta solamente 4 y 7 horas de tratamiento.
- Se evidenció que *P. putida* exhibió una alta tolerancia al endosulfán hasta una concentración de 1 mg/L. En el diseño dosis-respuesta, el tratamiento 6 (*P. putida*, *M. oleifera* y endosulfán a las 5 h) disminuyó la  $T_s$  con un valor de 32  $\text{mNm}^{-1}$  y la  $E_{24}$  fue del 100%. Adicionalmente, La presencia del MoSe y una alta concentración celular de *P. putida*  $>10^8$  unidades logarítmicas mejoraron la producción de biosurfactante de la bacteria.

- La funcionalización del *MoSe* en corcho aumentó el potencial de actividad antimicrobiana y redujo significativamente el crecimiento de *E. coli* con un porcentaje >99.99%. Asimismo, la técnica vqPCR utilizada en t = 0 y 6 h indicó la utilidad de este método rápido y su sensibilidad para mostrar el efecto de funcionalización en cuanto a viabilidad bacteriana (% vqPCR), que se redujo a valores de 0.024 y 0.005% de microorganismos viables obteniendo valores de  $1.03 \times 10^3$  y  $1.80 \times 10^2$  copias / mL, respectivamente.
- Se evidenció que el sistema hidropónico NFT logró disminuir microorganismos patógenos como *E. coli* y parámetros fisicoquímicos como sólidos disueltos, pH y oxígeno disuelto.
- El sistema de biofiltros funcionalizados con el extracto de semillas de *M. oleifera* acoplado a sistema hidropónico NFT fue capaz de reducir *E. coli* con un valor  $<10^1$  y parámetros fisicoquímicos como sólidos disueltos y el pH.



---

---

## 9. REFERENCIAS

- Abbasi H., Sharafi H., Alidost L., Bodagh A., Zahiri H.S., Noghabi K.A. (2013) Response surface optimization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 43:398–414.
- Abdelmoez W., Barakat N., Moaz A. (2013) Treatment of wastewater contaminated with detergents and mineral oils using effective and scalable technology. *Water Sci. Technol.* 68:974-981.
- Abolore M., Saedi M., Hammed A. (2016) *Moringa oleifera* seed extract: a review on its environmental applications. *Int. J. Appl. Environ. Sci.* 6:1469-1486.
- Acosta-Martínez V., Cruz L., Sotomayor-Ramírez D., Pérez-Alegría L. (2007) Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Appl. Soil Ecol.* 35:35–45.
- Adewale S., Similoluwa A., Kolawole A. (2021) Phytochemical and antibacterial investigation of *Moringa oleifera* seed: experimental and computational approaches, *Eclética Química*, vol. 46, no. 2, pp. 17-25.
- Aguilar M, Saez J, Llorens M. (2005) Improvement of coagulation-flocculation process using anionic polyacrylamide as coagulant aid. *Chemosphere.* 58:47-56.
- Aguilar L., Gallegos A., Arias C. (2019) Microbial nitrate removal efficiency in groundwater polluted from agricultural activities with hybrid cork treatment wetlands. *Sci. Total Environ.* 653:723–734.
- Alcántara V., Cram S., Gibson R. (2013) Method development and validation for the simultaneous determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in a complex sediment matrix. *J. AOAC International.* 96:854-863.
- Almuktar S.A.A.A.N., Scholz M. (2016) Mineral and biological contamination of soil and *Capsicum annum* irrigated with recycled domestic wastewater. *Agric. Water Manag.* 167:95–109.
- Almuktar S.A.A.A.N., Scholz M., Al-Sawi R.H.K., Sani A. (2015) Recycling of domestic wastewater treated by vertical-flow wetlands for irrigating chillies and sweet peppers. *Agric. Water Manag.* 149:1–22.
- Almuktar S.A.A.A.N., Abed, S.N., Scholz, M. (2018) Wetlands for wastewater treatment and subsequent recycling of treated effluent: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25(24):23595–23623. doi:10.1007/s11356-018-2629-3.
- Amézquita-López B.A., Quiñones B., Soto-Beltrán M., Lee B.G., Yambao J.C., Lugo-Melchor O.Y., Chaidez C. (2016) Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 5:1. doi.org/10.1186/s13756-015-0100-5.

- APG (Angiosperm Phylogeny Group). (2009) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161:105-121.
- APHA. (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA. 1265p.
- Aranberri I., Binks B., Clint J. (2006) Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. Revista iberoamericana de polímeros. 7(3):21.
- ASTM International. (2008) Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions E2149.
- Ashraf M.A., Batool S, Ahmad M., Sarfraz M., Noor W.S.A.W.M. (2016) Biopolymers as biofilters and biobarriers. Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials. Woodhead Publishing. 1st edition, pp. 387–420. doi:10.1016/b978-0-08-100214-8.00017-8.
- Ayaz F. (2003) On the two-dimensional differential transform method. Applied Mathematics and Computation. 143:361–374.
- Bailey A.M., Coffey M.D. (1986) Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. Can. J. Microbiol. 32(7):562–569. doi:10.1139/m86-105.
- Barba L. (2002) Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición. Escuela de ingeniería de recursos naturales y del ambiente. Universidad del Valle. 51p.
- Barton L., Schipper L., Barkle G., McLeod M., Speir T., Taylor M., McGill A., Van Schaik A., Fitzgerald N., Pandey S. (2005) Land application of domestic effluent onto four soil types. J. Environ. Qual. 34:635–643.
- Basuald J., Cordoba M., Roccia I. (2001) Isolation and characterization of injured coliforms from the drinking water distribution network of La Plata, Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 33:9-14.
- Basler G., Thompson M., Tullman-Ercek D. (2018) A *Pseudomonas putida* efflux pump acts on short-chain alcohols. Biotechnol Biofuels. 11:136 <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1133-9>.
- Bhatt P., Verma A., Gangola S. (2021) Microbial glycoconjugates in organic pollutant bioremediation: recent advances and applications. Microb Cell Fact. 20:72. doi.org/10.1186/s12934-021-01556-9.
- Bawiec A., Pawęska K., Pulikowski K. (2016) Seasonal changes in the reduction of biogenic compounds in wastewater treatment plants based on hydroponic technology. J. Ecol. Eng. 17:128–134.

- Beltrán de Heredia J., Domínguez J.R, López R. (2004) Treatment of cork process wastewater by a successive chemical–physical method. *J. Agric. Food Chem.* 52(14):4501–4507.
- Bichi M.H. (2013) A Review of the applications of *Moringa oleifera* seeds extract in water treatment. *Civil Environ. Res.* 3(8):1-10.
- Biniarz P., Łukaszewicz M., Janek T. (2016) Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37(3):393–410. doi:10.3109/07388551.2016.1163324.
- Bonvin C., Etter B., Udert K.M., Frossard E., Nanzer S., Tamburini F., Oberson A. (2015) Plant uptake of phosphorus and nitrogen recycled from synthetic source-separated urine. *Ambio.* 44:217–227.
- Botello A.V., Rendón J., Gold G., Agraz C. (2005) Golfo de México contaminación e impacto ambiental, Diagnóstico y tendencias. Segunda edición, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 695p.
- Bouyahya A., Dakka N., Et-Touys A., Abrini J., Bakri Y. (2017) Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10(8):729–743. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.07.021.
- Bradford M.A. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brix H. (1993) Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance. *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*, 1st edition, pp 9–22.
- Brummell D.A., Harpster M.H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47:311–339.
- Burgos C. (2012) Biotensoactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp. Nov.: Producción, caracterización y propiedades. Universitat de Barcelona. 216p.
- Bustamante N., Durán M. (2012) Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 12(4):667-687.
- Carmona E., Valladares C. (2014) La sustentabilidad agrícola de las chinampas en el Valle de México: caso Xochimilco. *Revista Mexicana de agronegocios.* 34:669-709.
- Carvalho R.C., Bastos R.G., Fonseca-Souza C. (2018) Influence of the use of wastewater on nutrient absorption and production of lettuce grown in a hydroponic system. *Agric. Water Manag.* 203:311–321.
- Cawthorn D., Botha S., Witthuhn R. (2008) Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter Sakazakii* African infant formula milks and the processing environment. *Int. J. Food Microbiol.* 127:129-138.

- Chahal C., van den Akker B., Young F., Franco C., Blackbeard J., Monis P. (2016) Pathogen and particle associations in wastewater. *Adv. Appl. Microbiol.* 63–119. doi:10.1016/bs.aambs.2016.08.001.
- Chávez B., Luna M., Dendooven I. (2011) Denitrification in a chinampa soil of México city as affected by methylparathion: a laboratory study. *Eur. J. Soil Biol.* 47:271–278.
- Chávez B., Luna M., Dendooven I. (2011) Removal of methyl parathion from a chinampa agricultural soil of Xochimilco México: a laboratory study. *Eur. J. Soil Biol.* 47:264–269.
- Chrzanowski Ł., Ławniczak Ł., Czaczyk K. (2011) Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(2), 401–419. doi:10.1007/s11274-011-0854-8.
- Chen W. Wu. L., Frankenberger W.T., Chang A.C. (2008) Soil enzyme activities of long-term reclaimed wastewater-irrigated soils. *J. Environ. Qual.* 37:36–42.
- Cherif A.T., Molenat J., Elmidaoui E. (1997) Nitric acid and sodium hydroxyde generation by electro dialysis using bipolar membrane. *J. Appl. Electrochem.* 27:1069–1074.
- Chong H., Li Q. (2017) Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microb. Cell Factories.* 16(1):137. doi:10.1186/s12934-017-0753-2.
- Choy S., Nagendra K., Wu T. (2016) Performance of conventional starches as natural coagulants for turbidity removal. *Ecol. Eng.* 94:352–364.
- Choy S., Prasad K., Wu T. (2014) Utilization of plant-based natural coagulants as future alternatives towards sustainable water clarification. *J. Environ. Sci.* 26:2178–2189.
- Choy S.Y., Prasad M.N., Wu T.Y., Raghunandan M.E., Ramanan R.N. (2014) Utilization of plant-based natural coagulants as future alternatives towards sustainable water clarification. *J. Environ. Sci.* 26(11):2178–2189. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.09.024>.
- Chuo S., C. Abd-Talib N, Mohd-Setapar S., H. Hassan H., Nasir H. M., Ahmad A., Lokhat D., G. M. Ashraf. (2018) Reverse micelle extraction of antibiotics using an eco-friendly sophorolipids biosurfactant. *Sci. Rep.* 8:477. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18279-w>.
- Chubar N., Carvalho J.R., Correia M.J.N. (2003) Cork biomass as biosorbent for Cu(II), Zn(II) and Ni(II). *Colloids Surf. A.* 230:57–65.
- Clark R. (2004) Hydration, the forgotten hydrocolloid property en Williams PA, Phillips, GO. (Eds.) *Gums & Stabilisers for the Food Industry* 12:346–353 Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Conagua. Comisión Nacional del Agua. (2017) Situación del subsector de agua potable, drenaje y saneamiento. *Conagua*, Semarnat. México.

- Cooper D., Goldenberg G. (1987) Surface-active agents from two bacillus species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2:224-229.
- Coriolano M. C., Brito J. S., Ferreira G. R. S., Moura M. C., Melo C. M. L., Soares A. K. A., Coelho L. C. B. B. (2019) Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. *South African Journal of Botany.* doi: 10.1016/j.sajb.2019.06.014.
- Costa C., Medronho B., Filipe A., Mira I., Lindman B., Edlund H., Norgren M. (2019) Emulsion formation and stabilization by biomolecules: The leading role of cellulose. *Polymers.* 11(10):1570. doi.org/10.3390/polym11101570.
- Costa, J. (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(5):299-305.
- Da Silva Cuba Carvalho R., Bastos R. G., Souza, C. F. (2018) Influence of the use of wastewater on nutrient absorption and production of lettuce grown in a hydroponic system. *Agric. Water Manag.* 203, 311–321. doi:10.1016/j.agwat.2018.03.028.
- De Araújo A. A., Soares L.A.L., Assunção Ferreira M.R., de Souza Neto M.A., da Silva G.R., de Araújo R.F., de Melo M.C.N. (2014) Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *J Ethnopharmacol.* 156:88–96. doi: 10.1016/j.jep.2014.07.031.
- De Paula H. M., De Oliveira M. S., Andrade D. (2014) Concrete plant wastewater treatment process by coagulation combining aluminum sulfate and *Moringa oleifera* powder. *J. Clean. Prod.* 76:125-130. doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.04.031.
- Dickinson E. (2006) Structure formation in casein-based gels, foams, and emulsions. *colloids surf, A Physicochem. Eng. Asp.* 288(1) 3-11.
- Dickinson E. (2009) Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll.* 23(6):1473-1482.
- Dominguez V., Priolo G., Alves A., Cabral M., Delerue C. (2007) Adsorption behavior of  $\alpha$ -cypermethrin on cork and activated carbon. *J. Environ. Sci. Health B.* 42:649–654.
- Dos Santos E. (2007) Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis de Doctorado, Facultad de Veterinaria, UAB, España.
- Drakontis E., Amin S. Biosurfactants: formulations, properties, and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* doi:10.1016/j.cocis.2020.03.013.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J. (2020) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 1956; 28:350-356.

- Durgananda S., Saravanamuth V., Huu-hao N. (2003) Biofilter in water and wastewater treatment. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 20:1054-1065. doi: 10.1007/bf02706936.
- Dyśko J., Kaniszewski S., Kowalczyk W. (2008) The effect of nutrient solution pH on phosphorus availability in soilless culture of tomato. *J. Elem.* 13:189–198.
- Elkazzaz K.A., Elkazzaz A.A. (2017) Soilless agriculture a new and advanced method for agriculture development: an introduction. *Agricultural Research & Technology*. 3:63-71. doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.03.555610.
- EPA (Environmental Protection Agency). Persistent organic pollutants: A global issue, a global response. (2009) Accedido en línea 20 de octubre de 2018. <https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response#pops>.
- Englande A. J., Krenkel P., Shamas J. (2015) Wastewater treatment and reclamation. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. B978-0-12-409548-9.09508-7. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.09508-7.
- Engle C.R. Economics of Aquaponics. SRAC Publication No. 5006 Southern Regional Aquaculture Center. 2015.
- Fakruddin M. (2012) Biosurfactant: production and application. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 3:124. doi: 10.4172/2157-7463.1000124.
- Falcioni T., Papa S., Gasol J. (2008) Evaluating the flow-cytometric nucleic acid double-staining protocol in realistic situations of planktonic bacterial death. *Appl. Env. Microbiol.* 74(6):1767-1779. doi: 10.1128/AEM.01668-07.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Water pollution from agriculture: a global review. 2017a. Italy: FAO and IWNI.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Chinampa agricultural system in Mexico City. 2017b. Consultado en: <http://www.fao.org/3/I9159EN/i9159en.pdf>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Pollutants from agriculture a serious threat to world's water. 2018. Consultado en: <http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/en/c/1141953/>.
- Farooq A., Latif S., Ashraf M. (2007) *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*. 21:17-25.
- Fernández M., Duque E., Pizarro-Tobías P., van Dillewijn P., Wittich R.-M., Ramos J. L. (2009). Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbial Biotechnology*. 2(2):287–294. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00085.x.
- Ferreira L.E, Dalposso K., Hackbarth B.B., Goncalves A.R. Westphal G.A., Franca P.H., Pinho S. (2011) Molecular panel for detection of sepsis-related microorganisms. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 23:36-40.

- Fonseca A.F.D., Herpin U., Paula A.M.D., Victória R.L., Melfi A.J. (2007) Agricultural use of treated sewage effluents: agronomic and environmental implications and perspectives for Brazil. *Scientia Agricola*. 64:194–209.
- Foulds I., Guy R., Kappor A., Xiao C., Krull U., Horguen P. (2002) Application of quantitative real-time PCR with dual-labeled hydrolysis probes to microbial water quality monitoring. *J. Biom. Techniques*. 13:272–276.
- Francesko A., Blandón L., Vazquez M. (2015) Enzymatic functionalization of cork surface with antimicrobial hybrid biopolymer/silver nanoparticles. *ACS Appl. Mat. Interfaces*. 7(18):9792-9799.
- Friedel J., Langer T., Siebe C., Stahr K. (2000) Effects of long-term wastewater irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. *Biology and Fertility of Soils*. 31:414–421.
- García-Cayuela T., Tabasco R., Peláez C., Requena T. (2009) Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. *International Dairy Journal*. 19(6-7):405–409. doi:10.1016/j.idairyj.2009.02.001.
- García L., Bravo L.Z., Vampos G.F., Medina D.C. (2015) Acción Antimicrobiana de la Pterigospermina de *Moringa olífera* sobre los contaminantes del agua y su efecto en el pH, turbidez y crecimiento microbiano. *Revista Electrónica de la Facultad de Ingeniería*. 3(1):11-19.
- García-Pérez A., Harrison M., Chivers C., Grant B. (2016) Recycled shredded-tire chips used as support material in a constructed wetland treating high-strength wastewater from a bakery: case study. *Recycling*. 1:3–13. doi.org/10.3390/recycling1010003.
- García X. (2011) Producción de biosurfactantes por microorganismos aislados de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Ambiental, Instituto Politécnico Nacional. 128p.
- García-Varela R., García-García R., Barba-Dávila B., Fajardo-Ramírez O., Serna-Saldívar S., Cardineau G. (2015) Antimicrobial Activity of *Rhoeo discolor* phenolic rich extracts determined by flow cytometry. *Molecules*. 20(10):18685–18703. doi:10.3390/molecules201018685.
- Garibyan L., Avashia N. (2013) Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(3):1–4. doi:10.1038/jid.2013.1.
- Gebeyehu A., Shebeshe N., Kloos H., Belay S. (2018) Suitability of nutrient removal from brewery wastewater using a hydroponic technology with *Typha latifolia*. *BMC Biotechnology*. 18:174.
- Guil-Guerrero J., L. Ramos L., Moreno C., Zúñiga-Paredes J. C., Carlosama-Yepez M. Ruales P. (2016) Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livestock Science*. 189:32-49. doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.021.

- Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V. (2013) A Broader View: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*. 1–18. doi:10.1155/2013/329121.
- Gil J., Soto A., Usma J. (2012) Contaminantes emergentes en aguas, efectos posibles y tratamientos. *Producción más limpia*. 2:52-73.
- Glynn H., Heinke G. *Ingeniería ambiental*. Segunda edición, 1999, 647p.
- Gómez S. Estudio y diseño de biofiltro a partir de materia orgánica para el tratamiento de agua. (2006) Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C. 141p.
- Gonçalves F., Correia P., Silva S.P., Almeida-Aguiar C. (2016) Evaluation of antimicrobial properties of cork. *FEMS Microbiology Letters*. 363(3):fnv231.
- González F., Casadinho C., Weber J. (2009) El endosulfán y sus alternativas en América Latina. *International POPs Elimination Network*. IPEN. 148p.
- Grewal H.S., Maheshwari B., Parks S.E. (2011) Water and nutrient use efficiency of a low-cost hydroponic greenhouse for a cucumber crop: an Australian case study. *Agric. Water Manag.* 98:841–846.
- Gutiérrez K., Acevedo M. (2016) Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de canales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*. 7:23-31.
- Haddad H.R., Maine M.A., Bonnetto C.A. (2006) Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere*. 63:1744–1753.
- Haddad M., Mizyed N. (2011) Evaluation of various hydroponic techniques as decentralized wastewater treatment and reuse systems. *Int. J. Environ. Sci.* 68:461–476. doi:10.1080/00207233.2011.582701.
- Haddad M., Mizyed N., Masoud M. (2012) Evaluation of gradual hydroponic system for decentralized wastewater treatment and reuse in rural areas of Palestine. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 5:47–53.
- He L., Tan T., Gao Z., Fan L. (2019) The shock effect of inorganic suspended solids in surface runoff on wastewater treatment plant performance. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 16(3):453. doi:10.3390/ijerph16030453.
- Heipieper H.J, Neumann G, Cornelissen S, Meinhardt F. (2007) Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(5):961–973. doi: 10.1007/s00253-006-0833-4.
- Helmer R, Hespanhol I. (1999) Control de la contaminación del agua. Guía para la aplicación de principios relacionados con la calidad. CEPIS. OPS/OMS. Perú.
- Helmer R, Hespanhol I. (1997) Water pollution control- a guide to the use of water quality management principles. *Ecological effects of wastewater*. Thomson Professional. 1997, 526p.



- Hitendra B., Folkard G.K., Chaudhari S. (2007) Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. *J. Hazard. Mater.* 142(1-2):477-482.
- Hong K., Tokunaga S., Kajiuchi T. (2002) Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. *Chemosphere.* 49(4):379-387.
- Huda A., Kristin J.J., McCullough L.R., Velegol D., Velegol S.B. (2012) Antimicrobial sand via adsorption of cationic *Moringa oleifera* protein. *Langmuir.* 28(4):2262-2268. doi: 10.1021/la2038262.
- Husain F., Alkhatib F., Jammi S., Mirghani S., Zainudin B., Hoda A. (2014) Problems, control, and treatment of fat, oil, and grease (FOG): A Review. *J. Oleo Sci.* 2014. 63(8):747–752. doi:10.5650/jos.ess13182.
- Infante N., Aldama C., Medellín N. (2015) Removal of oils and greases in wastewater: comparative study of chemical coagulants and *Moringa oleifera*. *Solución a la problemática del agua en México: Propuesta de jóvenes investigadores.* 1:759-766.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Encuesta Industrial Mensual. Resumen anual 2000. Primera edición. México, DF, 2000.
- James J.B., Sherman T.D., Devereux R. (2006) Analysis of bacterial communities in seagrass bed sediments by double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA Genes. *Microb. Ecol.* 52(4):655–661. doi:10.1007/s00248-006-9075-3.
- Janek T., Krasowska A., Czyżnikowska Ż., Łukaszewicz M. (2018) Trehalose lipid biosurfactant reduces adhesion of microbial pathogens to polystyrene and silicone surfaces: An Experimental and Computational Approach. *Front. Microbiol.* 9:2441. doi:10.3389/fmicb.2018.02441.
- Jiménez D., Medina S., Gracida J. (2010) Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 26:65-84.
- Joo S., Park P., Park S. (2019) Applicability of propidium monoazide (PMA) for discrimination between living and dead phytoplankton cells. *PLOS ONE.* 14(6):e0218924. doi:10.1371/journal.pone.0218924.
- Juárez-Figueroa L.A., Silva-Sánchez J., Uribe-Salas F.J., Cifuentes-García E. (2003) Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco canals, Mexico City. *Salud Pública de México.* 45(5):389-395.
- Kaya D., Dilek F.B., Gökçay C.F. (2007) Reuse of lagoon effluents in agriculture by posttreatment in a step feed dual treatment process. *Desalination.* 215:29–36.
- Kebreab A.G., Gunaratna K.R., Henriksson H., Brumer H.A. (2005) Simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Res.* 11: 2338-2344. doi10.1016/j.watres.2005.04.012.

- Kilic E., Font J., Puig R C., olak S.C., elik D. (2011) Chromium recovery from tannery sludge with saponin and oxidative remediation. *J. Hazard. Mater.* 185(1):456– 462.
- Kosegarten C., Jimenez M. (2012) Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 2:1-18.
- Karigar C.S, Rao S.S. (2011) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A Review. *Enzyme Res.* 2011:1–11. doi:10.4061/2011/805187.
- Kregiel D., Berlowska J., Witonska I., Antolak H., Proestos C., Babic M., Zhang B. (2017) Saponin-based, biological-active surfactants from plants. Application and Characterization of Surfactants. *INTECH.* 2017, pp 183-205. doi:10.5772/68062.
- Krishnasamy K., Nair J., Bauml B. (2012) Hydroponic system for the treatment of anaerobic liquid. *Water Sci. Technol.* 65:1164–1171.
- Kruif C., Tuiner R. (2001) Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocoll.* 15:555-562.
- Kubota M., Nakabayashi T., Matsumoto Y., Shiomi T., Yamada Y., Ino K., Yamanokuchi H., Matsui M., Tsunoda T., Mizukami F., Sakaguchi K. (2008) Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 64(1):88–97. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.01.012.
- Kurniawan S., Abdullah S., Imron M., Said N., Ismail N., Hasan H., Purwanti I. (2020) Challenges and oportunities of biocoagulant/bioflocculant application for drinking water and wastewater treatment and its potential for sludge recovery. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17(24):9312. doi:10.3390/ijerph17249312.
- Kyongmi Chon, Jin-Soo Chang, Eunkyung Lee, Jinwook Lee, Jiyoung Ryu, Jaeweon Cho. (2011) Abundance of denitrifying genes coding for nitrate (narG), nitrite (nirS), and nitrous oxide (nosZ) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fed constructed wtlands. *Ecol. Eng.* 37:64-69.
- Lane D. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. in: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley & Sons: New York, NY, USA. 115–147.
- Lee K.E., Morad N., Teng T.T., Poh B. (2012) Development, characterization and the application of hybrid materials in coagulation/flocculation of wastewater: a review. *Chem. Eng. J.* 203:370–386. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.109>.
- Lema I. (2011) Diagnóstico de la situación del endosulfán en México. Dirección general de investigación sobre la contaminación urbana y regional. Dirección de investigación sobre sustancias químicas y riesgos ecotoxicológicos. 53p.
- Lequin S., Chassagne D., Karbowskiak T., Simon J.M., Paulin C., Bellat J.P. (2012) Diffusion of oxygen in cork. *J. Agric. Food Chem.* 60(13):3348–3356.

- Li F., Li X., Zhou S. (2010) Enhanced reductive dichlorination of DDT in an anaerobic system of dissimilatory iron-reducing bacteria and iron oxide. *Environ. Pollut.* 158:1733-1740.
- Lin C., Lin K. (2007) Photocatalytic oxidation of toxic organohalides with TiO<sub>2</sub>/uv: the effects of humic substances and organic mixtures. *Chemosphere.* 66:1872-1877.
- Liu Z., Li Z., Zhong H., Zeng G., Liang Y., Chen M., Shao B. (2017) Recent advances in the environmental applications of biosurfactant saponins: A review. *J. Environ. Chem. Eng.* 5(6), 6030–6038. doi:10.1016/j.jece.2017.11.021
- López C. (2017) Líquidos iónicos surfactantes. Comportamiento liotrópico e interacción con polímeros. UNED tesis doctoral. 342p.
- Lubello C., Gori R., Nicese F.P., Ferrini F. (2004) Municipal-treated wastewater reuse for plant nurseries irrigation. *Water Res.* 38:2939–2947.
- Ma Y., He X., Peng X. (2011) Study on isolation and purification of saponin from Sapindaceae with Macroporous resin. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae.* 17:23-25.
- Macey MG. (2010) Principles of flow cytometry. In: Macey MG, editor. *Flow cytometry: principles and applications.* Totowa (NJ): Humana Press; p. 1–15.
- Machado A.I, Beretta M., Fragoso R., Duarte E. (2017) Overview of the state of the art of constructed wetlands for decentralized wastewater management in Brazil. *J. Environ. Manage.* 187:560-570. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman; 2016.11.015>.
- Madrona G.S., Serpelloni G.B., Salcedo Vieira A.M., Nishi L., Cardoso K.C., Bergamasco R. (2010) Study of the effect of saline solution on the extraction of the *Moringa oleifera* seed's active component for water treatment. *Water Air Soil Pollut.* 211(1-4):409–415.
- Maity J.P., Huang Y.M., Fan C.-W., Chen C.-C., Li C.-Y., Hsu C.-M., Chang Y-F., Wu C-I., Chen C-Y., Jean, J.-S. (2013) Evaluation of remediation process with soapberry derived saponin for removal of heavy metals from contaminated soils in Hai-Pu, Taiwan. *J. Environ. Sci.* 25(6):1180–1185. doi:10.1016/s1001-0742(12)60162-4.
- Manahan E. (2006) *Introducción a la química ambiental.* Reverte. 1st edición, 760p.
- Mansour S. (2004) Pesticide exposure Egyptian scene. *Toxicology.* 198:91–115.
- Mansouri M., Harkat M-F., Nounou H.N., Nounou M.N. (2020) Conclusions and perspectives. *Data-Driven and Model-Based Methods for Fault Detection and Diagnosis.* 2020:259–278. doi:10.1016/b978-0-12-819164-4.00016-9.
- Marchant R., Banat M. (2012) Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol. Lett.* 34(9):1597–1605. doi:10.1007/s10529-012-0956-x.

- Marín A. (2009) Efectos secundarios por el uso del herbicida paraquat en el cultivo de jicama (*pachyhizus erosus* L.) en la localidad de la Trinidad Tepango, Atlixco, Puebla. Maestra en ciencias. Colegio de postgraduados, 165 p.
- Martin M., Gargallo S., Hernández C., Oliver N. (2013) Phosphorus and nitrogen removal from tertiary treated urban wastewater by vertical flow constructed wetland. *Ecol. Eng.* 6:34–42.
- Martínez C., Gómez S. (2007) Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 23:185-200.
- Martínez J., Rivera J., Houbron E. (2013) Caracterización de aguas residuales universitarias y determinación de la eficiencia de tratamiento de las PTAR de la UV existentes de la región Córdoba-Orizaba. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas, 18p.
- Maurya A., Singh M.K., Kumar S. (2020) Biofiltration technique for removal of waterborne pathogens. *Waterborne Pathogens.* 2020:123–141. doi.org/10.1016/B978-0-12-818783-8.00007-4.
- Mavrogianopoulos G., Vogli V., Kyritsis S. (2002) Use of wastewater as a nutrient solution in a closed gravel hydroponic culture of giant reed. *Bioresour. Technol.* 82:103–107.
- Mcclements D., Weiss J. (2005) Lipid emulsion. In F. Shahidi (ed.), *Bailey's industrial oil and fat products* (6th ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Meda A., Cornel P. (2010) Aerated biofilter with seasonal varied operation modes for the production of irrigation water. *Water Sci. Technol.* 61:1173–1181.
- Mekuto L., Ntwampe S.K.O., Akcil A. (2016) An integrated biological approach for the treatment of cunidation wastewater. *Sci. Total Environ.* 571:711–720.
- Meleiro A., Zelayara G., Kasemodel M. (2011) Biodegradation of pesticides. In: Stoytcheva M. *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*, 407-438. doi: 10.5772/17686.
- Miles A., Misra S. (1938) The estimation of the bactericidal power of the blood, U.K. *Journal Hygiene.* 38:732-749.
- Mir Z.A., Ali S., Tyagi A., Ali A., Bhat J.A., Jaiswal P., Oves M. (2017) Degradation and conversion of endosulfan by newly isolated *Pseudomonas mendocina* ZAM1 strain. *3 Biotech.* 7(3):211. doi:10.1007/s13205-017-0823-5.
- Mita S., Keraita B., Olsen A. (2012) Use of *Moringa oleifera* seed extracts to reduce helminth egg numbers and turbidity in irrigation water. *Water Res.* 46:3646-3656.
- Mnif I., Ellouz-Chaabouni S., Ghribi D. (2017) Glycolipid biosurfactants, main classes, functional properties and related potential applications in environmental biotechnology. *J. Polym. Environ.* 26(5):2192–2206. doi:10.1007/s10924-017-1076-4.

- Montgomery D.C. (2012) Design and analysis of experiments. 8<sup>th</sup> ed. Arizona: John Wiley & Sons.
- Mousavi S., Khodadoost F. (2019) Effects of detergents on natural ecosystems and wastewater treatment processes: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26:26439–26448. doi:10.1007/s11356-019-05802-x.
- Muga H.E., Mihelcic J.R. (2008) Sustainability of wastewater treatment technologies. *J. Environ. Manage.* 88:437–447.
- Mulligan C. (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133(2):183-198.
- Mulligan C. (2009) Recent advances in the environmental applications of biosurfactantes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14(5):372-378. doi.org/10.1016/j.cocis.2009.06.005.
- Nabinejad A. (2013) Antibacterial effects of *Saponaria officinalis* extracts against avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Afr. J. Agric. Res.* 8(18):2068-2071. doi:10.5897/AJAR11.1390.
- Navaratna D., Shu I., Jegatheesan V. (2013) Existence, impacts, transport and treatments of herbicides in great barrier reef catchments in Australia. Treatment of micropollutants in water and wastewater. Primera edición. 524-545.
- Ndabigengesere A., Narasiah K.S., Talbot B.G. (1995) Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. *Water Res.* 29:703.
- Nelson V.I. New (2008) Approaches in Decentralized Water Infrastructure. Coalition for Alternative Wastewater Treatment (Gloucester MA).
- Nepolean P., Anitha J., Emilin Renitta R. (2009) Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam. *Current Biotica.* 3(1):33-39.
- Nogva H.K., Dromtorp S.M., Nissen H., Rudi K. (2003) Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 50-nuclease. *PCR BioTechniques.* 810:804–813.
- Nocker A., Fernandez P.S., Burr M.D., Camper A.K. (2007) Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5111–5117.
- Nonna S. (2006) La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente. Organización Panamericana de la Salud. Primera edición. 298 pp.
- Norström A., Larsdotter K., Gumaelius L., la Cour Jansen J., Dalhammar G. (2003) A small-scale hydroponics wastewater treatment system under Swedish- conditions. *Water Sci. Technol.* 48(11–12):161–167.

- Norton-Brandao D.J., Scherrenberg S.M., van Lier J.B. (2013) Reclamation of used urban waters for irrigation purposes. A review of treatment technologies. *J. Environ. Manag.* 122:85–98.
- Nouhi S., Kwaambwa H.M., Gutfreund P., Rennie A.R. (2019) Comparative study of flocculation and adsorption behaviour of water treatment proteins from *Moringa peregrina* and *Moringa oleifera* seeds. *Sci. Rep.* 2019:9(1). doi:10.1038/s41598-019-54069-2
- OEFA. Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental. Fiscalización Ambiental en Aguas Residuales. 2014. Consultado en: [https://www.oefa.gob.pe/?wpfb\\_dl=7827](https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827).
- Okuda T., Baes A.U., Nishijima W., Okada M. (1999) Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. *Water Res.* 33(15):3373–3378.
- Olson M., Razafimandimbison S. (2000) *Moringa hildebrandtii*: a tree extinct in the wild but preserved by indigenous horticultural practices in Madagascar. *Adansonia.* 22(2):217-221.
- Olson M. (2002) Combinación de datos de secuencias de ADN y morfología para una filogenia de Moringaceae. *Botánica Sistemática.* 27(1):55-73.
- OMS. Organización mundial de la salud. Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan. 2019. Consultado en: <file:///C:/Users/NuryInfante/Downloads/9789240016057-spa.pdf>.
- OPS. Organización Panamericana de la Salud. Medio ambiente y seguridad humana. 2012. Consultado en: [http://www.paho.org/saludenlasamericas/index.php?option=com\\_content&view=article&id=56&itemid=52&lang=es](http://www.paho.org/saludenlasamericas/index.php?option=com_content&view=article&id=56&itemid=52&lang=es).
- ONU Organización de las Naciones Unidas. Agua para un mundo sostenible: Informe de las Naciones Unidas sobre los Recursos hídricos del mundo. 2015. UNESCO. Consultado en: [www.unesco.org/fileadmin/.../HQ/SC/.../WWDR2015Facts\\_Figures\\_SPA\\_web.pdf](http://www.unesco.org/fileadmin/.../HQ/SC/.../WWDR2015Facts_Figures_SPA_web.pdf).
- ONU Organización de las Naciones Unidas. *Decenio Internacional para la Acción "Agua para el Desarrollo Sostenible"*, 2018-2028. 2021. Consultado: <https://www.un.org/en/events/waterdecade/index.shtml>.
- Ortiz I., Rodríguez A., Sánchez E. (2014) Bioremediation of soils contaminated with pesticides: experiences in México. *Bioremediation in Latin America. Current Research and Perspectives.* Primera edición, Londres, 69p.
- Osem Y., Chen Y., Levinson D., Hadar Y. (2006) The effects of plant roots on microbial community structure in aerated wastewater-treatment reactors. *Ecol. Eng.* 29:133–142.
- Osorio F., Torres J.C., Sánchez M. (2011) Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes.: aplicación de procesos industriales a la reutilización de aguas residuales. Ediciones Díaz de Santos, 216p.

- Othmani B., Rasteiro M., Khadhraoui M. (2020) Toward green technology: a review on some efficient model plant-based coagulants/flocculants for freshwater and wastewater remediation. *Clean Technol. Environ. Policy*. 2020. 22:1025–1040. <https://doi.org/10.1007/s10098-020-01858-3>
- Ottoson J., Norstrom A., Dalhammar G. (2005) Removal of micro-organisms in small scale hydroponics wastewater treatment system. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:443–447.
- Oyama N., Nair J., Ho G.E. (2008) Comparison of pathogen die-off patterns of tomatoes grown in two hydroponic systems. 1st International Conference on Technologies & Strategic Management of Sustainable Biosystems. Fremantle; 6–9 pp.
- Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. (2011) Environmental applications of biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12(1), 633–654. doi:10.3390/ijms12010633.
- Palleroni N. (1981) Introduction to the family pseudomonadaceae. Springer-Verlag U.S.A., pp 656-694.
- Parales R., Ditty I., Harwood C. (2000) Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:4098-4104.
- Pardossi A., Incrocci L. (2011) Traditional and new approaches to irrigation Scheduling in Vegetable Crops. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 21(3):309–313.
- Pereira L.S., Duarte E., Fragoso R. (2014). Water use: Recycling and desalination for agriculture. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 407–424. doi:10.1016/b978-0-444-52512-3.00084-x.
- Pintor A.M.A., Ferreira C.I.A., Pereira J.C., Correia P., Silva S.P., Vilar V.J.P., Botelho C.M.S, Boaventura R. (2012) Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: a review. *Water Res.* 46:3152-3166. doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.048.
- Prazeres A.R., Rivas J., Almeida M.A., Patanita M., Dôres J., Carvalho F. (2016) Agricultural reuse of cheese whey wastewater treated by NaOH precipitation for tomato production under several saline conditions and sludge management. *Agric. Water Manag.* 167:62–74.
- Prazeres A.R., Albuquerque A.L.S., Jerónimo, E., Carvalho F. (2017). Hydroponic system: A promising biotechnology for food production and wastewater treatment. *food biosynthesis*, pp 317–350. doi:10.1016/b978-0-12-811372-1.00011-7
- Pritchard M., Craven T., Mkandawire T.A. (2010) Comparison between *Moringa oleifera* and chemical coagulants in the purification of drinking water – An alternative sustainable solution for developing countries. *Physics and Chemistry of the Earth*. 35(13-14):798-805.

- Pruthi V., Cameotra S. (1995) Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation. *Biotechnology Techniques*. 9:271-276.
- Puerto A., Suárez S., Palacio D. (2014) Effects of pesticides on health and the environment. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 52:1561-3003.
- Pyne A., Phillipp M., Bennett I. (2017) Engineering monolayer poration for rapid exfoliation of microbial membranes. *Chem*. 2017:1105-1115.
- Qadir M., Wichelns D., Raschid Sally L., McCornick P.G, Dreschel P., Bahri A., Minhas P.S. (2010). The challenges of wastewater irrigation in developing countries. *Agric. Water Manag.* 97:561–568.
- Qin Z., Zhang J., Hu Y., Chi Q., Mortensen N.P., Qu D., Molin S., Ulstrup J. (2009) Organic compounds inhibiting *S. epidermidis* adhesion and biofilm formation. *Ultramicroscopy*.109(8):881–888. DOI: 10.1016/j.ultramic.2009.03.040.
- Rababah A.A, Ashbolt N.J. (2000) Innovative production treatment hydroponic farm for primary municipal sewage utilization. *Water Res.* 34:825–834.
- Rackoy J.E., Masser M.P., Losdo T.M. (2006) Recirculating aquaculture tank production systems: Aquaponics - Integrating Fish and Plant Culture SRAC Publication. 454:1–16.
- Raiger L., López N. (2009) Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista Química Viva*. 3:146-160.
- Rakocy E.J. (1997) Integrating Tilapia culture with vegetable hydroponics in recirculating systems. *Tilapia Aquaculture in Americas*. 1:163–184.
- Ramírez H., Peralta J. (2015) Agentes naturales como alternativa para el tratamiento del agua. *Universidad Militar Nueva Granada*. 11:136-153.
- Ramírez-Malule H., Quiñones-Murillo D.H., Manotas-Duque D. (2020) Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. *Emerg. Contam.* 6:179–193. doi:10.1016/j.emcon.2020.05.001.
- Ramos R., García H., Ortega M. (2011) Artificial chinampas soils of México city: their properties and salinization hazards. *Spanish J. Soil Sci.* 1:70-85.
- Rasheed T., Bilal M., Nabeel F., Adeel M., Iqbal H.M.N. (2019) Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environ. Int.* 122:52-66. doi:10.1016/j.envint.2018.11.038.
- Ravindran J., Daniel R., Kumari S. (2012) Effect of agricultural pesticides, Hostathion and Kitazin on the Larvivorsity of the Carnatic Rice Fish, *Oryzias carnaticus*. *Am.-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 4(2):56-59.
- Robertson J., McGoverin C., Vanholsbeeck F., Swift S. (2019) Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid



---

Determination of Bacterial Load. *Front. Microbiol.* 10:801. doi:10.3389/fmicb.2019.00801

- Roca C. (2014) Guía para la realización de PCR real time de viabilidad (vqPCR). Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Medio ambiental (MSMLab), pp 37.
- Rocha A.J., Barsottini M.R. de O., Rocha R.R., Laurindo M.V., Moraes F.L.L., Rocha S.L. (2019) *Pseudomonas Aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 62(62):19180503. doi:10.1590/1678-4324-2019180503
- Rocher V., Paffoni G., Guérin S., Azimi S., Gasperi J., Moilleron R., Paus A. (2012) Municipal wastewater treatment by biofiltration: comparisons of various treatment layouts. Part 1: assessment of carbon and nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* 65(9):1705-1712.
- Rodríguez-Eugenio N., McLaughlin M., Pennock D. (2019) La contaminación del suelo: una realidad oculta. Roma, FAO.
- Rodríguez-Vázquez R. (2018) Reporte Final, Convenio Cinvestav-Autoridad de la Zona Patrimonial de la Ciudad de México.
- Rosemarin A., Macura B., Carolus J., Barquet K., Järnberg L., Okruszko T. (2020) Circular nutrient solutions for agriculture and wastewater – a review of technologies and practices. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 2020. 45:78–91. doi:10.1016/j.cosust.2020.09.007.
- Roy A. (2017) A review on the biosurfactants: Properties, types and its applications. *J. Fundam. Renew. Energy Appl.* 8(1):1000248 doi: 10.4172/2090-4541.1000248.
- Roy D., Kommalapati R., Mandava S. (1997) Soil washing potential of a natural surfactant. *Environ. Sci. Technol.* 31(3):670-675 doi: 10.1021/es960181y.
- Rubí H., Fall C., Ortega R.E. (2009) Pollutant removal from oily wastewater discharged from car washes through sedimentation-coagulation. *Water Sci. Technol.* 59(12):2359-2369.
- Rudi K., Moen B., Drømtorp S.M., Holck L. (2005) Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1018–1024.
- Rusan M.J.M., Hinnawi S., Rousan L. (2007) Long term effect of wastewater irrigation of forage crops on soil and plant quality parameters. *Desalination.* 215:143–152.
- Saa R.W., Fombang E.N., Ndjantou E.B., Njintang N.Y. (2019) Treatments and uses of *Moringa oleifera* seeds in human nutrition: A review. *Food Sci. Nutr.* 7:1911–1919. doi:10.1002/fsn3.1057
- Saini R.K., Sivanesan I., Keum Y.S. (2016) Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech.* 6(2):203. doi:10.1007/s13205-016-0526-3

- Salager J., Anton J. (2005) Métodos de medición de la tensión superficial o interfacial. Cuaderno Firps 205-B. Universidad de los Andes. Merida-Venezuela. 20p.
- Sambo P., Nicoletto C., Giro A., Pii Y., Valentinuzzi F., Mimmo T., Cesco S. (2019) Hydroponic Solutions for Soilless Production Systems: Issues and Opportunities in a Smart Agriculture Perspective. *Front. Plant Sci.* 10:923. doi:10.3389/fpls.2019.00923
- Sánchez Y., Martínez G., Sinagawa S. (2013) *Moringa oleifera*; importancia, funcionalidad y estudios involucrados. *Acta Química Mexicana.* 9:25-30.
- Santos D.K., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. (2016) Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int J Mol Sci.* 17(3):401. doi:10.3390/ijms17030401.
- Sanz-García F., Hernando-Amado S., Martínez J.L. (2018) Mutational evolution of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to ribosome-targeting antibiotics. *Front. Genet.* 9:451. DOI: 10.3389/fgene.2018.00451.
- Sarkar S., Seenivasan S., Premkumar R. (2009) Biodegradation of propiconazole by *Pseudomonas putida* isolated from tea rhizosphere. *Plant Soil Environ.* 5:196-201.
- Shebek K., Schantz A.B., Sines I., Lauser K., Velegol S., Kumar M. (2015) The flocculating cationic polypeptide from *Moringa oleifera* seeds damages bacterial cell membranes by causing membrane fusion. *Langmuir.* 31(15):4496–4502. doi:10.1021/acs.langmuir.5b00015.
- Schrammel E. (2014) A Cost –benefit analysis of hydroponic wastewater treatment in Sweden. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Schulze-Makuch D., Pillai S.D., Guan H., Bowman R., Couroux E., Hielscher F., Totten J., Espinosa I.Y., Kretzschmar T. (2002) Surfactant-modified zeolite can protect drinking water wells from viruses and bacteria. *Eos, Transactions American Geophysical Union.* 83(18):193–201.
- Schurek K.N., Marr A.K., Taylor P.K., Wiegand I., Semene L., Khaira B.K., Hancock R.E.W. (2008) Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(12):4213–4219. doi: 10.1128/aac.00507-08.
- Scopel M., Wolf-Rainer A., Antunes A., Henriques A., Macedo A. (2014) Mevalonolactone: An inhibitor of *Staphylococcus Epidermidis* adherence and biofilm formation. *J. Medicinal Chem.* 10(3):246-251. doi: [10.2174/15734064113096660055](https://doi.org/10.2174/15734064113096660055).
- Shan T.C., Matar A.M., Makky E.N., Ali E.N. (2016) The use of *Moringa oleifera* seed as a natural coagulant for wastewater treatment and heavy metals removal. *Applied Water Science.* 7(3):1369–1376. doi: <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0499-8>.
- Sherratt A.R., [Rouleau Y.](#), [Luebbert C.](#), [Strmiskova M.](#), [Veres T.](#), [Bidawid S.](#), [Corneau N.](#), Pezacki J.P. (2017) Rapid screening and identification of living pathogenic

- organisms via optimized bioorthogonal non-canonical amino acid tagging. *Cell Chem. Biol.* 24(8):1048-1055.
- Snow A., Ghaly A.E.A. (2008) Comparative assessment of hydroponically grown cereal crops for the purification of aquaculture wastewater and the production of fish feed. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 3:364–378.
- Sokol H., Lepage P., Seksik P., Doré J., Marteau P. (2006) Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active *Escherichia coli* in the microbiota of patients with ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol.* 44(9):3172–3177 doi.org/10.1128/JCM.02600-05
- Solanki P., Narayan M., Srivastava R.K. (2017) Effectiveness of domestic wastewater treatment using floating rafts a promising phyto-remedial approach: a review. *J. appl. Nat. Sci.* 9(4):1931–1942.
- Solórzano M. (2010) Uso de quitosano como coagulante alternativo en el tratamiento de agua para potabilización en el río Fonseca, Boaco. Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ingeniería Química, 102p.
- Song S., Zhu L.Z, Zhou W.J. (2008) Simultaneous removal of phenanthrene and cadmium from contaminated soils by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environ. Pollution.* 156(3):1368–1370.
- Soni R., Bhardwaj S., Shukla D.P. (2020) Chapter 14 - Various water-treatment technologies for inorganic contaminants: current status and future aspects. *Inorganic Pollutants in Water.* Elsevier, pp 273–295. doi:10.1016/b978-0-12-818965-8.00014-7.
- Stiefel P., Schmidt-Emrich S., Maniura-Weber K., Ren Q. (2015) Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology.* 15(1):36. doi:10.1186/s12866-015-0376-x.
- Stottmeister U., Wießner A., Kuschik P., Kappelmeyer U., Caster M., Bederski O., Müller R.A, Moormann H. (2003) Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22:93–117.
- Sunitha V., KrishnaMurthy R.M. (2012) Degradation of endosulfan by mixed bacterial cultures enriched from endosulfan contaminated soils of Southern India. *Int J Biosci. Biochem. Bioinforma.* 2(1):31-35.
- Sutherland J.P., Bayliss A.J., Braxton D.S. (1995) Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food. Microbiol.* 25(1):29–49. doi.org/10.1016/0168-1605(94)00082-h.
- Tamburini S., Ballarini A., Ferrentino G., Mor A., Foladori P., Spilimbergo S., Jousson O. (2013) Comparison of quantitative PCR and flow cytometry as cellular viability methods to study bacterial membrane permeabilization following supercritical CO<sub>2</sub> treatment. *Microbiology.* 159(Pt\_6):1056–1066. doi: 10.1099/mic.0.063321-0.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. (2013) Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 30:2725-2729.

- Teh C.Y., Budiman P.M., Shak K.P., Wu T.Y. (2016) Recent advancement of coagulation–flocculation and its application in wastewater treatment. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55(16):4363–4389. doi.org/10.1021/acs.iecr.5b04703.
- Tiso T., Ihling N., Kubicki S., Biselli A., Schonhoff A., Bator I., Blank L.M. (2020) Integration of genetic and process engineering for optimized rhamnolipid production using *Pseudomonas putida*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:976. doi:10.3389/fbioe.2020.00976.
- Tsao D. (2003) Overview of phytotechnologies. *Phytoremediation.* 78:1–50.
- WWAP. United Nations World Water Assessment Program. Water for people, Water for life. UNESCO, Paris. 2003. Consultado: <https://www.un.org/esa/sustdev/sdissues/water/WWDR-spanish-129556s.pdf>.
- UNEP. Endosulfan. Risk Profile. Persistent Organic Pollutants Review Committee at its fifth meeting. 2009. Consultado en: <http://chm.pops.int/Convention/POPs%20Review%20Committee/Chemicals/tabid/781/language/en-GB/Default.aspxUNEP/POPS/POPRC.5/10/Add.2>.
- UNEP. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente Propuesta sobre el endosulfán. UNEP/POPS/POPRC.3/5 Examen de un producto químico, endosulfán, recientemente propuesto para su inclusión en los anexos A, B o C del Convenio Ginebra, 19 a 23 de noviembre de 2007. Consultado: <http://chm.pops.int/default.aspx>.
- Vaillant N., Monnet F., Sallanon H., Coudret A., Hitmi A. (2003) Treatment of domestic wastewater by a hydroponic NFT system. *Chemosphere.* 50:121–129.
- Van Hamme J., Singh A., Ward O. (2006) Physiological aspects: part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology.* 24:604-620.
- Van Os E. (1999) Design of sustainable hydroponic systems in relation to environment friendly disinfection methods. *International Symposium on Growing Media and Hydroponics.* 548:197–206.
- Van S., Nagendra K., Yeong W. (2016) Performance of conventional starches as natural coagulants for turbidity removal. *Ecol. Eng.* 94:352-364.
- Varjani S.J., Chaithanya M. (2017) Treatment Technologies for Emerging Organic Contaminants Removal from Wastewater. In: Bhattacharya S., Gupta A., Gupta A., Pandey A. *Water Remediation. Energy, Environment, and Sustainability.* Springer, Singapore. *Water Remediation*, pp 91–115. doi:10.1007/978-981-10-7551-3\_6.
- Vega M., Jimenez M., Salgado R. (2005) Determinación de bacterias de origen fecal en hortalizas cultivadas en Xochimilco de octubre de 2003 a marzo de 2004. *Investigación Universitaria multidisciplinaria.* 4:21-25.
- Verdcourt B. (1985) A Synopsis of the Moringaceae. *Kew Bulletin.* 40(1):1-23. DOI: 10.2307/4108470.

- Verlicchi P., Zambello E. (2014) How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban wastewaters? A review. *Science of the Total Environment*. 470-471:1281-1306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014; 10.085>.
- Villaseca M., López V., Gutiérrez C. (2014) Valorization of waste obtained from oil extraction in *Moringa oleifera* seeds: Coagulation of reactive dyes in textile effluents. *Materials*. 7:6569-6584.
- Villaseca M. (2007) Respirometría electrolítica en el diseño y explotación de depuradoras. *Boletín Intexter*. Universidad Politécnica de Cataluña, España. 132:51-56.
- Vinita V., Singh U., Billore S. (2008) Efficiency of root zone technology for treatment of domestic wastewater. *Proceedings of Taal2007: The 12th World Lake Conference*: 995-1003.
- Vymazal J. (2010) Constructed wetlands for wastewater treatment. *Water*. 2(3):530–549. [doi.org/10.3390/w2030530](https://doi.org/10.3390/w2030530)
- Wilderer P., Davids L., Flemming H. (1998) Microorganisms and their role in soil. In: *bioremediation: principles and practice*. Volumen I: Fundamentals and applications. Pennsylvania, Estados Unidos, pp 283-332.
- Wilkerson M.J. (2012) Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 42(1):53–71. [doi:10.1016/j.cvsm.2011.09.012](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.012)
- Wu S., Kusch P., Brix H., Vymazal J., Dong R. (2014) Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: a nitrogen and organic matter targeted review. *Water Res.* 57:40–55.
- Xiong B., Piechowicz B., Wang Z., Marinaro R., Clement E., Carlin T., Uliana A., Kumar M., Velegol S.B. (2018) *Moringa oleifera* f-sand filters for sustainable water purification. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5(1):38–42. [doi:10.1021/acs.estlett.7b00490](https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00490).
- Xu H., Scherrenber S.M., van Lier J.B. (2012) Dissolved oxygen, COD, nitrogen and phosphorus profiles in a continuous sand filter used for WWTP effluent reclamation. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*. 66(7):1511–1518.
- Yañez G., Sanchez E., Otríz M. (2011) Removal of methyl parathion and tetrachlorvinphos by a bacterial consortium immobilized on tezontlepacked up-flow reactor. *Biodegradation*. 22(6):1203-1213. [doi 10.1007/s10532-011-9475-z](https://doi.org/10.1007/s10532-011-9475-z).
- Yang C. (2010) Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment. *Process Biochemistry*. 45(9):1437-1444.
- Yuan Y., Zheng G., Lin M., Mustapha A. (2018) Detection of viable *Escherichia coli* in environmental water using combined propidium monoazide staining and quantitative PCR. *Water Res.* 145:398-407. [doi:10.1016/j.watres.2018.08.044](https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.044).

- 
- Zamora S., Marín-Muñiz J.L, Nakase-Rodríguez C., Fernández-Lambert G., Sandoval L. (2019) Wastewater treatment by constructed wetland eco-technology: Influence of mineral and plastic materials as filter media and tropical ornamental plants. *Water*. 11(11):2344. doi:10.3390/w11112344.
- Zhao X., Yu Z., Ding T. (2020) Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms*. 8(3):425. doi: 10.3390/microorganisms8030425.
- Zhou W., Yang I., Zhu Z. (2011) Solubilization properties of polycyclic aromatic hydrocarbons by saponin, a plant derived biosurfactant. *Environ. Pollut.* 159:1198-1204.
- Zhou J.L, Roeland S., Mantoura R. (1995) Partition of synthetic pyrethroid insecticides between dissolved and particulate phases. *Water Res.* 29:1023–1031.
- Zhou X.-H., Huang B.-C., Zhou T., Liu Y.-C., Shi H.-C. (2015) Aggregation behavior of engineered nanoparticles and their impact on activated sludge in wastewater. *Chemosphere*. 119:56–576.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Resultados del ANOVA con un valor  $p < 0.05$  y su prueba LSD del efecto del extracto de las semillas sobre la tensión superficial, actividad emulsificante, oxígeno disuelto, conductividad, pH, actividad antimicrobiana, azúcares totales y proteínas solubles.

Factor	Nivel	Prueba LSD	Interpretación	Mejor tratamiento
<b>Tensión superficial</b>	-1 1	A	Hay diferencias entre los tratamientos	2 (TP 0.86mm, CMC 700 mg/L, TC 20 min, CD 1700 $\mu$ s/cm, pH 8.5)
		B		
		C		
		D		
		E		
<b>Actividad emulsificante</b>	-1	A	Hay diferencia entre los tratamientos	7 (TP 2 mm, CMC 1500, TC 20 min, CD 1500 $\mu$ s/cm y pH 8.5)
	1	B		
<b>Oxígeno disuelto</b>	-1	A	Hay diferencias entre los tratamientos	7 (TP 2 mm, CMC 1500, TC 20 min, CD 1500 $\mu$ s/cm y pH 8.5)
	1	B		
<b>Conductividad</b>	-1 1	A	Hay diferencias entre los tratamientos	3 (TP 2mm, CMC 700, 20 min, cd 4000 $\mu$ s/cm y pH 7)
		B		
		C		
		D		
<b>pH</b>	-1 1	A	Hay diferencias entre los tratamientos	4 (TP 2 mm, CMC 700, TC 60 min, CD 1700 $\mu$ s/cm y pH 7)
		B		
		C		
		D		
		E		

<b>Actividad antimicrobiana</b>	-1 1	A B	No hay diferencia entre los tratamientos	8 (TP 2 mm, CMC 1500, TC 60 min, CD 4000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ y pH 8.5)
<b>Azúcares totales</b>	-1 1	A B	No hay diferencia entre los tratamientos	8 (TP 2 mm, CMC 1500, TC 60 min, CD 4000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ y pH 8.5)
<b>Proteínas solubles</b>	-1 1	A B C D	Hay diferencias entre los tratamientos	3 (TP 2mm, CMC 700, 20 min, cd 4000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ y pH 7)

## Anexo 2. Congresos y cursos

Infante N., Rodríguez R., Morató J. (2021) Ponencia oral sobre tecnologías para el tratamiento de aguas residuales en el Foro “El uso adecuado del agua residual y otras medidas para mitigar la escasez de agua en tiempo de sequía” Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, El consejo de la Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla.

Infante N., Rodríguez R. (2020) Primer Taller de Biorremediación para el mejoramiento de la calidad del suelo y el agua. Carmen de Apicalá, Colombia.



Infante N., Rodríguez R., Morató J., Aguilar R., Thalasso-Siret. (2019) Purification with *Moringa oleifera* of a pretreated wastewater from the Chinampera Zone of México city. SETAC Europe 29th Annual Meeting from 26 –30 May 2019 in Helsinki, Finland.



Infante N., Rodríguez R., Morató J., Aguilar R., Thalasso-Siret. (2018) Determinación de la exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas de la zona chinampera. Puerto Vallarta, México.


Infante N. (2019) Curso práctico de PCR aplicada en tiempo real para Microbiología ambiental, dentro del MSMLab de la Universitat Politècnica de Catalunya, con una duración total de 25 horas.


### Anexo 3. Artículo publicado

Article

## Biofunctionalization of Cork with *Moringa oleifera* Seeds and Use of PMA Staining and qPCR to Detect Viability of *Escherichia coli*

Nury Infante <sup>1</sup>, Refugio Rodríguez <sup>1,\*</sup>, Yaneth Bartolo <sup>1</sup>, Olga Sánchez <sup>2</sup>, Isabel Sanz <sup>3</sup> , Lizeth Bermeo <sup>4</sup> and Jordi Morató <sup>5</sup>

 **check for updates**

**Citation:** Infante, N.; Rodríguez, R.; Bartolo, Y.; Sánchez, O.; Sanz, I.; Bermeo, L.; Morató, J. Biofunctionalization of Cork with *Moringa oleifera* Seeds and Use of PMA Staining and qPCR to Detect Viability of *Escherichia coli*. *Water* **2021**, *13*, 2731. <https://doi.org/10.3390/w13192731>

Academic Editor: Anna Barra Caracciolo

Received: 15 August 2021

**Abstract:** Cork matrices biofunctionalized with *Moringa oleifera* seed extracts (*MoSe*) have potential for use as a biofilter with antibacterial properties to reduce waterborne pathogens. The aim of this study was to evaluate the effect of cork biofunctionalized with active antimicrobial compounds of *MoSe* (*f*-cork) on the inhibition of *Escherichia coli* (*InhEc*). The *LacZ* gene from a strain of *E. coli* was used as the target sequence using viability quantification Polymerase Chain Reaction (qPCR) and differentiation of viable and dead bacteria through selective cell viability PMA staining. To perform this, a 2<sup>7-4</sup> fractional factorial design and a biofiltration system were used to evaluate the effect of the active protein in *MoSe* immobilized in granulated cork on *InhEc*. We found that the potential for antimicrobial activity increased with *f*-cork for an effective maximal bacterial reduction (99.99%; *p* < 0.05). The effect of *f*-cork functionalized with *MoSe* on *E. coli* viability was of 0.024% and 0.005% for the cells exposed to PMA, respectively, being the relevant conditions in treatment 2: (0 L/min) without aeration, (5%) *MoSe* and (5 mm) cork particle. In conclusion, the *f*-cork functionalized with *MoSe* presented biosorbent and antibacterial properties that effectively reduced the *E. coli* growth.