

ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS PSICRÓFILAS FIJADORAS DE  
NITRÓGENO EN REACTORES BIOLÓGICOS SECUENCIALES (SBR)

MARÍA CAMILA RAMOS GÓMEZ

DIRECTORA  
Prof. JANETH SANABRIA PhD.

UNIVERSIDAD DEL VALLE  
SEDE MELÉNDEZ  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL MEDIO  
AMBIENTE  
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL  
SANTIAGO DE CALI  
2019

## DEDICATORIA

A mis padres por haberme formado como el ser humano que soy ahora; muchos de mis logros se los debo tan solo a ustedes, y éste es uno de mis mayores logros sin duda. Mi madre con su fuerza, disciplina y exigencia. Mi padre con su dulzura. Gracias por todo el amor que me brindan a diario, y por todo el esfuerzo que realizan para poder acompañarme en cada etapa de mi vida, son una mujer y un hombre maravillosos y una gran bendición. Me educaron entre reglas y algunas libertades, pero al final del día estaban allí para motivarme a alcanzar mis anhelos y colmarme de amor y dedicación. No hay mejores que ustedes, los amo.

A mi hermano, que aún a la distancia, puedo sentir su amor, y sé que allá lejos te sientes orgulloso por mis logros. Nuestras alegrías serán siempre compartidas. Te amo muchísimo.

A mi abuela por su amor, dulzura y acompañamiento. Gracias por lo que haces por nosotros a diario.

A mi Kenji que me llena de alegría y amor con tan sólo mirarlo. Estoy convencida que entiendes cada uno de mis sentimientos, porque siempre sabes qué hacer y cómo brindarme tu compañía en el momento indicado.

A mis familiares por estar siempre al pendiente de todo éste proceso y por mandarme sus mejores energías y motivaciones a terminar.

A mis amigos, los que me escucharon día a día en el desarrollo de la vida universitaria (o tan sólo me vieron cuando no quería hablar), los que me acompañaron y me dieron voces de aliento. Sé que sus frases, sus abrazos siempre fueron sinceros, con sus acciones y gestos me hacen sentir una mujer muy amada.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias por todo el amor que logré recibir, la fortaleza y motivación por parte de mis padres, hermano, abuela, familiares y amigos. Los ánimos y alientos a culminar mi proceso académico.

Agradezco a la profesora Janeth Sanabria por dejarme pertenecer al grupo de investigación GAOX. Gracias por confiar en mí y en mis capacidades, gracias por ser una mujer fuerte que ha sacado adelante un gran grupo de investigación. Sus capacidades de liderazgo son gigantes y debo agradecerle por inspirarnos a ser siempre los mejores en lo que hacemos. Gracias por no dejarme caer y por hacerme fuerte con sus palabras.

Un agradecimiento especial a Dany Acevedo por ser la mamá querendona de todos en el laboratorio. Tu amor es muy grande y lo brindas a diario a cada integrante del grupo GAOX. Gracias por tu paciencia, entrega y motivación. Gracias por decirnos que sí se puede terminar y se puede de la mejor manera. Gracias por sacarnos de miles de inconvenientes y por tirarte al fuego por nosotros, es un acto de mucho amor y confianza. Eres un excelente ser humano Dany.

Gracias al grupo GAOX y sus demás integrantes, tesis de maestría y doctorado, pasantes, estudiantes internacionales, que siempre están dispuestos a ayudar, apoyar y compartir mucho conocimiento. Cada uno es un grandioso investigador, con muchísimas capacidades. Gracias por su ayuda y aliento.

Especialmente gracias al profesor Carlos A. Madera por ser un excelente ser humano. En su faceta de profesor, de director de programa y de jefe siempre entrega lo mejor. Por más de dos años trabajé a su lado y pude conocer muchas cualidades que lo hacen ser una gran persona. Gracias por su ánimo, por alentarme, motivarme y siempre confiar en mí desde el primer momento. Gracias por siempre incluirme y hacerme sentir cómoda y querida en mi lugar de trabajo y como estudiante.

Gracias a mi compañera de trabajo y amiga Paula Álvarez. Del mismo modo como el profe Carlos, gracias por confiar en mí y por ser parte importante de mi proceso de tesis. Gracias por hacerme sentir querida e incluida, por escucharme y darme muchos ánimos, por todos los momentos compartidos en un buen ambiente de trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| 1. CONTEXTO PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | <b>9</b>  |
| 2. ANTECEDENTES  | <b>13</b> |
| 3. MARCO TEÓRICO                                       | <b>16</b> |
| 3.1 FIJACIÓN DE NITRÓGENO                              | 16        |
| 3.1.1 Fijación de nitrógeno no biológica               | 16        |
| 3.1.1.1 Vía descarga eléctrica                         | 16        |
| 3.1.1.2 Antropogénica                                  | 16        |
| 3.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN)              | 17        |
| 3.2.1 Fijación simbiótica de nitrógeno                 | 18        |
| 3.2.2 Fijación de nitrógeno asimbiótica                | 19        |
| 3.3 Enzima nitrogenasa                                 | 19        |
| 3.4 Bacterias psicrófilas                              | 20        |
| 3.5 Reactores secuenciales por lotes                   | 20        |
| 3.6 Medio de cultivo                                   | 21        |
| 3.6.1 Agar Nutritivo                                   | 22        |
| 3.6.2 Agar EMB   | 23        |
| 3.6.3 Agar RBA   | 23        |
| 4. OBJETIVOS   | <b>24</b> |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL                                   | 24        |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                              | 24        |
| 5. METODOLOGÍA   | <b>25</b> |
| 5.1 MONTAJE EXPERIMENTAL Y VARIABLES DE CONTROL        | 25        |
| 5.1.1 Ubicación del experimento                        | 25        |
| 5.1.2 Montaje experimental                             | 25        |
| 5.2 MUESTRAS   | 26        |
| 5.2.1 Lodo de PTAR papelera:                           | 26        |
| 5.2.2 Suelo agrícola de baja temperatura - SABT:       | 26        |
| 5.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN                         | 27        |
| 5.3.1. Variables observacionales                       | 27        |
| 5.3.2 Variables de control                             | 27        |
| 5.3.3. Variables de respuesta                          | 27        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>6. FASE EXPERIMENTAL</b>   | <b>29</b> |
| <b>6.1 FASE EXPERIMENTAL I</b>  | <b>29</b> |
| 6.1.1 Operación de los reactores  | 31        |
| 6.1.1.1 Alimentación  | 31        |
| 6.1.1.2 Reacción  | 33        |
| 6.1.1.3 Sedimentación   | 33        |
| 6.1.1.4 Vaciado   | 34        |
| <b>6.2 FASE EXPERIMENTAL II</b>   | <b>34</b> |
| 6.2.1 Operación de los reactores  | 35        |
| <b>6.3 MÉTODO DE ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>   | <b>35</b> |
| <b>7. RESULTADOS</b>  | <b>36</b> |
| <b>7.1 REACTORES INOCULADOS CON MICROORGANISMOS DE SUELO AGRÍCOLA DE BAJA TEMPERATURA</b> | <b>36</b> |
| 7.1.1 Amonio  | 36        |
| 7.1.2 Nitratos  | 37        |
| 7.1.3 Biomasa   | 38        |
| 7.1.4 Recuento en placa   | 39        |
| <b>7.2 REACTORES INOCULADOS CON MICROORGANISMOS DE LODO DE PTAR DE INDUSTRIA PAPELERA</b> | <b>41</b> |
| 7.2.1 Amonio  | 41        |
| 7.2.2 Nitratos  | 42        |
| 7.2.3 Biomasa   | 43        |
| 7.2.4 Recuento en placa   | 44        |
| <b>8. DISCUSIÓN</b>   | <b>46</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES</b>  | <b>50</b> |
| <b>10. RECOMENDACIONES</b>  | <b>52</b> |
| <b>11. REFERENCIAS</b>  | <b>53</b> |
| <b>12. ANEXOS</b>   | <b>61</b> |

## TABLA DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Condiciones de operación de los reactores                                      | 25 |
| <b>Tabla 2.</b> Técnica empleada el seguimiento de las variables de control                    | 27 |
| <b>Tabla 3.</b> Técnica empleada para cuantificación de las formas de amonio                   | 27 |
| <b>Tabla 4.</b> Composición de Solución A del sustrato de los reactores (medio RBA modificado) | 32 |
| <b>Tabla 5.</b> Composición de Solución B del sustrato de los reactores (medio RBA modificado) | 32 |
| <b>Tabla 6.</b> Composición de Solución SL-6 (elementos traza de medio RBA)                    | 33 |

## TABLA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Reactor tipo SBR                                      | 21 |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de Fase Experimental I y Fase Experimental II | 29 |
| <b>Figura 3.</b> Enriquecimiento y reacción de reactores tipo SBR      | 31 |

## TABLA DE IMÁGENES

|   |    |
|---|----|
| <b>Imagen 1.</b> Reactores a temperatura de $28\pm2^{\circ}\text{C}$  | 30 |
| <b>Imagen 2.</b> Montaje experimental y reactores a temperatura de $10\pm2^{\circ}\text{C}$                         | 30 |
| <b>Imagen 3.</b> Montaje experimental y reactores a temperatura de $10\pm2^{\circ}\text{C}$ en Fase Experimental II | 34 |

## TABLA DE GRÁFICAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Gráfica 1.</b> Concentración de amonio producido por microorganismos del suelo adaptados a 28±2°C y 10±2°C                                    | 36 |
| <b>Gráfica 2.</b> Concentración de nitratos producido por microorganismos del suelo adaptados a 28±2°C y 10±2°C                                  | 37 |
| <b>Gráfica 3.</b> Concentración de biomasa producida por microorganismos del suelo adaptados a 28±2°C y 10±2°C                                   | 38 |
| <b>Gráfica 4.</b> Recuentos en placa de reactores inoculados con microorganismos del suelo adaptados a 28±2°C y 10±2°C Fase Experimental I       | 39 |
| <b>Gráfica 5.</b> Recuentos en placa de reactores inoculados con microorganismos del suelo enriquecidos y operados a 10±2°C Fase Experimental II | 40 |
| <b>Gráfica 6.</b> Concentración de amonio producido por microorganismos de lodo adaptados a 28±2°C y 10±2°C                                      | 41 |
| <b>Gráfica 7.</b> Concentración de nitratos producido por microorganismos de lodo adaptados a 28±2°C y 10±2°C                                    | 42 |
| <b>Gráfica 8.</b> Concentración de biomasa producida por microorganismos de lodo adaptados a 28±2°C y 10±2°C                                     | 43 |
| <b>Gráfica 9.</b> Recuentos en placa de reactores inoculados con microorganismos de lodo adaptados a 28±2°C y 10±2°C Fase Experimental I         | 44 |
| <b>Gráfica 10.</b> Recuentos en placa de reactores inoculados con microorganismos de lodo enriquecidos y operados a 10±2°C Fase Experimental II  | 44 |

## ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Anexo 1.</b> Toma de muestra de lodo PTAR de PLanta I de Carvajal Pulpa y Papel, Yumbo (Valle)              | 61 |
| <b>Anexo 2.</b> Toma de muestra de suelo de cultivo de papa colorada y transporte, corregimiento Gabriel López | 61 |
| <b>Anexo 3.</b> Etapa de sedimentación en reactores  | 62 |
| <b>Anexo 4.</b> Preparación de material para realización de siembra en placa                                   | 62 |
| <b>Anexo 5.</b> Incubación de caja petri con Agar EMB, Agar Nutritivo y Agar RBA (24 y 48 horas)               | 63 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 6.</b> Ejemplo de morfologías de colonias encontradas en medio RBA (izq) y EMB (der) | 63 |
| <b>Anexo 7.</b> Ejemplo de morfologías vistas al microscopio en objetivo de 100X              | 64 |
| <b>Anexo 8.</b> Inyección de CO <sub>2</sub> a reactores para eliminación de protozoos        | 64 |

## 1. CONTEXTO PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La atmósfera está constituida en un 78% por nitrógeno molecular ( $N_2$ ). Este compuesto es inerte y no asimilable por la mayoría de los organismos debido a la fuerza del triple enlace entre los dos átomos ( $N \equiv N$ ). Es un elemento esencial para la vida y factor determinante en el crecimiento de plantas en los diferentes ecosistemas (Nieder & Bendi, 2008). Forma parte de los ácidos nucleicos, proteínas y enzimas, los cuales son componentes estructurales y funcionales de las células (Madigan, et al 2014). Los organismos vivos pueden tener acceso al Nitrógeno gracias al proceso de fijación, que consiste en la reducción de la molécula de  $N_2$  a amoníaco ( $NH_3$ ) y este a su vez, rápidamente es ionizado al ión amonio ( $NH_4^+$ ), esta reacción química, puede llevarse a cabo de manera biótica o abiótica (Dixon & Kahn, 2004). El proceso catalítico de síntesis de amonio de mayor importancia se conoce como proceso Haber-Bosch (HB) (Reid & Hehre, 2007).

La disponibilidad de nitrógeno para los cultivos agrícolas a nivel mundial, es garantizada en un 98% mediante la adición de fertilizantes nitrogenados resultantes de la síntesis química del amonio.

En la actualidad, cerca de 106.9 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados son usados en diferentes tipos de cultivos alrededor del mundo (Heffer & Prud'homme 2010). El enfoque agrícola hacia el uso excesivo de estos fertilizantes químicos ha provocado una alteración en el ciclo del Nitrógeno y, en consecuencia, la contaminación de las aguas superficiales, de las aguas subterráneas, degradación y deterioro de suelos agrícolas. Se estima que del total del nitrógeno aplicado con fines agrícolas, tan sólo un 30% es aprovechado por el cultivo y el porcentaje restante se puede perder en el suelo por lixiviado de sales (Urquiaga & Zapata, 2000). Otras problemáticas están ligadas al uso de combustibles fósiles para obtener la energía necesaria para la producción del fertilizante que significa el 1% de la energía consumida mundialmente (Olivares, 2008), que genera gases de efecto invernadero y a su vez tienen efectos adversos sobre la salud humana.

Uno de los principales efectos de la acumulación de nitritos en fuentes hídricas es la disminución del oxígeno disuelto (OD). La eutrofización en el agua dulce y en los

ecosistemas marinos resulta del incremento de nutrientes, principalmente nitratos y fosfatos, ocasionando un aumento en la producción de biomasa, disminución de la diversidad de especies, alta demanda de oxígeno, aparición excesiva de algas y vegetación que impide el paso de luz hacia la unidad acuática propiciando la descomposición de la materia orgánica, que potencia la desaparición del cuerpo de agua (Roldán & Ramírez, 2008). El agotamiento resulta mortal para organismos acuáticos y crea zonas muertas donde se puede encontrar poca o ninguna vida acuática (Wagner, 2011).

Desde 1960, las zonas muertas han aumentado exponencialmente en todo el mundo, y ahora se han documentado en más de 400 sistemas, afectando a más de 245.000 kilómetros cuadrados de regiones costeras (Diaz & Rosenberg, 2008). Por otro lado, estudios tienden a mostrar la incidencia entre el consumo de agua potable con presencia de nitratos en una dosis superior a 25 mg/L y la prevalencia de cánceres del tracto digestivo, colon y recto (Ward et al., 2005; De Roos et al., 2003; Gulis et al., 2002), dado que la ingesta de nitratos pueden reaccionar con alimentos parcialmente digeridos en el estómago dando lugar a las nitrosaminas que son compuestos cancerígenos y extremadamente reactivos (Sapiña, 2006).

Sobre su efecto en el suelo, la fertilización química realiza un aporte de nutrientes los cuales se acumulan y con el tiempo cambian las condiciones fisicoquímicas del mismo, trayendo entre otros, el problema de la salinización y acidificación de los suelos y la pérdida de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno (Byrnes, 1990). Adicionalmente, el incremento de las concentraciones de los derivados nitrogenados NO<sub>x</sub> y NH<sub>3</sub>, es, en parte, responsable del aumento de la concentración de ozono a nivel del suelo y de finas partículas de tamaño micrométrico (PM<sub>2,5</sub>) que puede incrementar la probabilidad de enfermedades cardiovasculares y respiratorias y de cánceres mortales (Estupiñan & Quesada, 2010)

A nivel atmosférico, el proceso Haber-Bosch se caracteriza por devengar altas cantidades de energía, lo que implica una alta utilización de combustibles fósiles, principales aportantes de gases de efecto invernadero. El uso de fertilizantes químicos a nivel global tiene un impacto sustancial sobre el clima del planeta, en particular, a través de la emisión de un potente gas de efecto invernadero (N<sub>2</sub>O), que contribuye en un 5% al fenómeno de calentamiento global actual (Foster et al., 2007).

De otra parte, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso llevado a cabo por un grupo especializado de microorganismos que actúan en simbiosis especialmente con plantas leguminosas, o de vida libre. Todos estos microorganismos hacen uso de la enzima nitrogenasa para reducir el N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> y representa un valor agregado en términos de sostenibilidad, razón por la cual ha sido objeto de investigación, desde su descubrimiento a principios del siglo XX, tomando un significado más relevante actualmente. Sobre la historia evolutiva de la fijación de nitrógeno podemos anotar que, sólo un número limitado de especies de bacterias y arqueas han desarrollado la capacidad de convertir N<sub>2</sub> en otras formas de nitrógeno reactivo, por tanto, incluso con adaptaciones al uso eficientemente de nitrógeno, muchos ecosistemas del mundo están limitados por la disponibilidad del elemento (Galloway et al., 2004). La FBN, es una alternativa que funciona frente al uso actual de fertilizantes generados por fijación industrial, disminuyendo su utilización y consecuente gasto energético y generación de impactos. Una de sus principales diferencias de la FBN, respecto a la fijación industrial, es que se realiza bajo condiciones normales de temperatura y presión. El limitante actual de ésta es que no se logra cubrir la demanda de nitrógeno por parte de la agricultura y adicionalmente, la FBN llevada a cabo por un grupo de microorganismos a modo de investigación en laboratorio cuentan con procesos de seguimiento muy estrictos, por lo que no presentan resistencia a ambientes reales donde hay una alta variabilidad de las condiciones.

Colombia es un país agrícola que destina amplias porciones de tierras para el cultivo, donde cerca de 2'869.913 hectáreas pertenecientes a 22 departamentos se encuentran destinadas al uso agrícola (DANE, 2016). Del total del área de uso agrícola, aproximadamente un 31% pertenece a regiones de clima frío (DANE, 2014). Los climas fríos presentan características biofísicas como los suelos ácidos, baja presión atmosférica, sequedad y humedad del aire, a la vez, bajas temperaturas con fuertes oscilaciones diurnas (Minambiente, 2017).

Las investigaciones sobre la fijación biológica de nitrógeno están avanzadas en climas tropicales. Se advierte que a bajas temperaturas los procesos enzimáticos se afectan de manera negativa (Velázquez et al, 2011). Se encuentran numerosos estudios sobre la fijación biológica de nitrógeno simbiótica a estas temperaturas, al igual que sobre las bacterias de vida libre en agua, donde se pueden mencionar las cianobacterias (Stal,

2009). A pesar de los muchos estudios sobre FBN de manera simbiótica, la FBN asimbiótica es un tema menos estudiado.

Se puede destacar que algunos microorganismos fijadores de nitrógeno pudieron haber desarrollado resistencia a muchas de las condiciones mencionadas anteriormente, al igual que a condiciones extremas como a las que se exponen microorganismos en sistemas de tratamiento de residuos sólidos y líquidos donde realizan sus procesos de degradación de materia orgánica y componentes químicos. Los estudios sobre la FBN haciendo uso de aguas residuales como inóculo es limitada. En especial, las aguas residuales de la industria del papel tienen la generalidad de contener cantidades limitadas de nitrógeno y fósforo por lo que es necesaria la adición de estos nutrientes con lo que se estabiliza la remoción de DBO en tratamientos de lodos activados. Los costos por la adición de nitrógeno a éste tipo de sistemas de tratamiento con tales requerimientos son anualmente significativos. El hecho de que algunas plantas de tratamiento operen sin la adición de nitrógeno tiene su justificación en la FBN llevada a cabo por bacterias presentes en el agua residual. Este proceso natural completó un aproximado de 600 kg de N/día a un sistema de tratamiento de aguas residuales localizado en Nueva Zelanda, por lo que la planta de tratamiento tuvo un aumento en la cantidad de concentración de nitrógeno total entre el efluente bruto y la descarga final (Clark et al, 1997). La importancia del estudio de sistemas de tratamiento de éste tipo está en que el exceso de lodos activados de PTARs con bacterias fijadoras de nitrógeno podrían ser deshidratados y convertidos en una fuente potencial de nutrientes para ser utilizados como fertilizantes (Gauthier et al, 2000).

El presente trabajo tiene como finalidad de estudiar la fijación biológica de nitrógeno asimbiótica a bajas temperaturas, adaptando consorcios microbianos fijadores de nitrógeno a temperaturas entre 8°C y 12°C, haciendo uso de reactores SBR, teniendo en cuenta los bajos costos de las muestras y la adaptación de los inóculos a las temperaturas mencionadas. Se espera la existencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en el lodo del STAR de la industria papelera y en el suelo de clima frío escogidos. Las condiciones en las que se encuentran los microorganismos provenientes de un lodo de PTAR supone su resistencia a ambientes extremos y la sobrevivencia en presencia de distintos compuestos. Adicionalmente se pretende generar una alternativa de selección de biofertilizante para climas fríos colombianos que funcione como estrategia para disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados.

## 2. ANTECEDENTES

Desde mediados del siglo pasado se han llevado a cabo investigaciones sobre la fijación biológica de nitrógeno (simbiótica y asimbiótica) a baja temperatura, principalmente en el agua con el estudio de las cianobacterias. Con el objetivo de conocer las tasas de fijación de nitrógeno y la incidencia de la temperatura frente a lo que ocurre en climas tropicales se ha estudiado el comportamiento de cianobacterias y otros microorganismos fijadores de nitrógeno en simbiosis a bajas temperaturas.

Gibson (1962), realizó un estudio sobre los efectos de la temperatura en la raíz de *Trifolium subterraneum* en simbiosis con la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium trifolii* con la finalidad de reconocer los cambios en crecimiento y fijación de nitrógeno de cuatro variedades de *Trifolium Subterraneum L.*, especie con la capacidad de recibir nitrógeno combinado por asociación. Se utilizaron como base para la comparación la interacción entre las variedades huésped, las cepas bacterianas y las condiciones de temperatura. La cantidad de nitrógeno fijada a 5°C fue sólo 10%-17% de la fijada a 18°C, dependiendo de la combinación de huésped y cepa. En el rango de temperatura baja (5°C-18°C), todas las combinaciones entre cepas y huésped mostraron un aumento en la producción adicional de nódulos a medida que subía la temperatura de la raíz.

La adaptación de la fijación de nitrógeno a ciertas condiciones de temperatura por parte del grupo *Peltigera Aphthosa*, fue estudiada por Kallio, et al. *Peltigera Aphthosa* es una especie de líquen que se encuentra distribuido en todas las regiones árticas, boreales y templadas del hemisferio norte. En éste estudio se destaca que la mayor actividad de la nitrogenasa se alcanza a una temperatura entre 20°C y 25°C, pero a temperaturas cercanas a 0°C, la actividad de la nitrogenasa en todas las muestras de líquenes estudiadas fue baja, siendo el 10-20% del óptimo a +7 ° C en las muestras extraídas de Estados Unidos y Finlandia. Por otro lado, los líquenes fijadores de nitrógeno estudiados tienen una actividad de solo un pequeño porcentaje de la tasa máxima a temperaturas de 0-5 ° C, que de hecho es el régimen de temperatura predominante en muchas áreas del Ártico. Para concluir, el estudio resalta que estos resultados son en condiciones de laboratorio, pero que difieren de la realidad del

Ártico porque se excluyen variables como la luz solar, vientos y truenos que son factores que potencian la fijación de N (Kallio et al, 1978).

Las cianobacterias marinas fijadoras de nitrógeno se encuentran principalmente en el océano tropical y subtropical (Rangel, 2008). Se ha argumentado que su distribución biogeográfica global refleja el rango de temperatura fisiológicamente factible en el que pueden realizar la fijación de nitrógeno. En éste sentido se estudia el efecto de la temperatura en el costo y el tiempo de fijación de nitrógeno en las cianobacterias del género *Cyanothece* (Brauer et al., 2013). Se comprueba que por debajo de los 21°C el costo respiratorio de la fijación de nitrógeno es cada vez más elevado. Las cianobacterias *Cyanothece* spp. son capaces de crecer en condiciones marginales a una temperatura de 14°C, sin embargo no se logra su cultivabilidad como diazótrofa.

*Aphanizomenon*, es un género reconocido de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en agua que representa una gran fracción de la fijación de N<sub>2</sub> en el verano en el Mar Báltico. Svedén et al. (2015) combinaron varios métodos para estudiar fijación la fijación de N<sub>2</sub>, fotosíntesis y la respiración de *Aphanizomenon* en el campo de muestreo del Mar Báltico durante el comienzo del verano a 10° C. La incubación del isótopo <sup>15</sup>N el cual es estable y no radiactivo se realizó a intensidades de luz *in situ* (luz artificial suministrada en laboratorio) durante 24 h buscando proporcionar a las bacterias condiciones para efectuar la fotosíntesis. Por lo tanto, aunque la fijación de N<sub>2</sub> continuó bajo irradiaciones más altas que las necesarias para la fotosíntesis, las tasas de fijación de N<sub>2</sub> netas del presente estudio podrían no estar en su máximo por condiciones de baja temperatura e irradiación excesiva.

Desde el grupo de investigación GAOX de la Universidad del Valle, se han adelantado propuestas e investigaciones en el marco de la fijación de nitrógeno con microorganismos de vida libre. Entre estas investigaciones se encuentra el “enriquecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre provenientes de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas”, con el supuesto de adaptación a la presencia de amonio para potencialmente ser utilizadas como biofertilizante (Pérez, 2011). Las bacterias diazotróficas fueron enriquecidas y cultivadas en medios líquidos que simularon las condiciones de un suelo degradado por salinidad y amonio. El estudio concluyó que en los inóculos provenientes de sistemas de tratamiento de agua residual doméstica, existen bacterias fijadoras de nitrógeno. Adicionalmente, la metodología empleada en el enriquecimiento y

adaptación de la biomasa potencialmente funcionaría como un mecanismo de obtención de un producto agrícola de uso complementario para la recuperación de suelos degradados por salinidad (Rodríguez, 2014).

Otra investigación desarrollada por el mismo grupo de investigación fue “fijación biológica de nitrógeno en suelos degradados, usando inóculos provenientes de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas (STARD)” donde se evaluó la biofertilización de nitrógeno en suelos salinos a partir de consorcios microbianos obtenidos de STAD. Del estudio se evidenció la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en cuatro sistemas de tratamiento de agua residual. Del mismo modo se obtuvo consorcios microbianos de dichas bacterias que se sostuvieron en un reactor sin fuente de nitrógeno en el sustrato. Adicional a los consorcios microbianos, se obtuvo un efluente rico en nitrógeno con posible utilidad en el ámbito biotecnológico (Rodríguez, 2014). Por último, Arroyo (2017) estudió una alternativa a escala de laboratorio para la producción de amonio y biomasa activa fijadora de nitrógeno a partir de un inóculo proveniente de sistemas de tratamiento de aguas residuales, además de la determinación del modelo cinético que representó el comportamiento de los microorganismos, donde se concluyó que a mayor concentración de sustrato (sacarosa) mayor producción de biomasa y fijación de nitrógeno.

Estudiar la FBN asimbiótica en frío, permitiría reconocer las condiciones de adaptación de microorganismos, las tasas de fijación de nitrógeno de las bacterias fijadoras resistentes a bajas temperaturas, con la finalidad de comprender y abarcar las dinámicas de fijación en éstas condiciones. Incentivando de ésta manera futuras investigaciones orientadas a brindar soluciones a las problemáticas ambientales actuales asociadas al uso de fertilizantes químicos, y el desarrollo de biofertilizantes que puedan ser usado en cultivos con dichas condiciones de temperatura.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El nitrógeno es un elemento abundante en la atmósfera terrestre, sin embargo, las plantas son capaces de asimilar formas reducidas de éste por lo que en la fijación de nitrógeno se busca la reducción del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a formas asimilables de nitrógeno como nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ), las cuales lo adquieren por: 1) adición de fertilizantes de amoníaco y/o nitrito producto del proceso de fijación antropogénico llamado Haber-Bosch donde se obtiene amoniaco por la exposición de nitrógeno molecular con hidrógeno y un catalizador a altas temperaturas y presiones, 2) liberación de nitrógeno en estado asimilable por la descomposición de materia orgánica, 3) conversión del nitrógeno atmosférico en formas reducidas por procesos naturales como los rayos, y 4) fijación biológica de nitrógeno (Vance, 2001).

##### 3.1.1 Fijación de nitrógeno no biológica

###### 3.1.1.1 Vía descarga eléctrica

El nitrógeno se fija de manera natural como  $NO_x$  por acción del rayo, lo que permite la introducción del N reactivo a regiones denominada alejadas de la troposfera. La producción global se ha estimado utilizando datos y modelos disponibles, pero con incertidumbres sustanciales, en parte debido a las dificultades de escalamiento que también consideran los posibles efectos del cambio climático en las tasas de producción de  $NO_x$  de los rayos. Las estimaciones de la fuerza global global de la fuente varían de 2 Tg N año a 10 Tg N año con los valores más recientes cercanos a 5 Tg N anualmente (Flower et al, 2013).

###### 3.1.1.2 Antropogénica

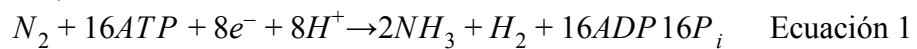
La fijación antropogénica de nitrógeno reducido ( $NH_3$ ), se efectúa a través de cultivos que fijan el nitrógeno donde su fuente principal a través del proceso de Haber-Bosch, en el que se combinan  $H_2$  y  $N_2$  a altas temperaturas y presiones en presencia de catalizador (Galloway et al, 2008). El proceso se desarrolló durante los primeros años del siglo XX y en la actualidad se producen anualmente 120 Tg N de  $NH_3$ , de los

cuales el 80% se utiliza como fertilizante agrícola y el 20% como materia prima para procesos industriales (Gallowat et al, 2008).

### 3.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN)

El gas dinitrógeno atmosférico es el mayor depósito de nitrógeno de libre acceso, pero es biológicamente disponible solo para microorganismos que transportan la metaloenzima nitrogenasa y por lo tanto puede reparar dinitrógeno en amoníaco. En la fijación biológica de nitrógeno los microorganismos hacen uso del N<sub>2</sub> como fuente de nitrógeno para la síntesis celular llevando el compuesto a productos como NH<sub>3</sub> el cual se ioniza de manera rápida a amonio (NH<sub>4</sub>). Es un proceso llevado a cabo por bacterias y arqueas (Figueroa, 2007) y les proporciona una competencia ventaja en entornos que están agotados de bio-nitrógeno disponible, pues codifican complejos de la enzima nitrogenasa compuesta de dos proteínas: la dinitrogenasa que es una proteína de hierro-molibdeno y la dinitrogenasa reductasa que es una hierro proteína (Stein & Klotz, 2016). La enzima nitrogenasa es la responsable de reducir los triples enlaces de la molécula de N<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> que es una forma de nitrógeno asimilable. Ésta enzima se inactiva en presencia de oxígeno (Travers, 2007).

Para el funcionamiento de la nitrogenasa se requiere de grandes cantidades de ATP (Ecuación 1)



Todas las nitrogenasas tienen dos componentes: *anfDGK*, *vnfDGK* o *nifDK* codifican el componente catalítico de nitrogenasas que tienen hierro, vanadio o molibdeno en el centro activo. Además, *anfH*, *vnfH* o *nifH* codifica proteínas de transferencia de electrones que contienen hierro (conocido como nitrogenasa reductasa o proteína de hierro). NifH es utilizado como marcador genético para la detección de fijación de nitrógeno microorganismos en el medio ambiente. Las bacterias *Azotobacter Vinelandii* codifican los tres tipos de nitrogenasas, mientras que otros microorganismos, como los fijadores marinos de nitrógeno *Trichodesmium spp.*, tienen solo MoFe nitrogenasa. Mientras que el vanadio rara vez limitante, el molibdeno y el hierro son raros en la tierra y medio ambiente marino,

respectivamente, y por lo tanto pueden limitar la fijación de nitrógeno en estos ecosistemas (Kuypers et al., 2018).

Este proceso es altamente consumidor de energía, por ésta razón el triple enlace formado para unir a los dos átomos de nitrógeno es duro de romper. El trabajo que desempeña la acción combinada con el complejo enzimático de la nitrogenasa (Baca et al., 2000) implica el consumo de 16 moléculas de ATP por cada molécula de N reducido, donde el proceso se opera a temperatura ambiente y presión parcial de N<sub>2</sub> de 0.78 atm. Un ejemplo más claro se encuentra en el caso de algunos fijadores libres como la *Azotobacter* necesita de hasta 100 unidades equivalentes de glucosa por cada molécula de nitrógeno fijado (Olivares, 2008).

Los microorganismos que fijan el nitrógeno obtienen esta energía (ATP) oxidando moléculas orgánicas. Los microorganismos no-fotosintéticos de vida libre deben obtener estas moléculas de otros organismos, mientras que los microorganismos fotosintéticos, como las cianobacterias, usan azúcares producidos por la fotosíntesis. Los microorganismos asociativos y simbióticos fijadores de nitrógeno obtienen estos compuestos de las rizosferas de sus plantas huésped (National Research Council, 1994 - Hubbell & Kidder, 2009). Microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno también son parte de la microbiota intestinal de animales como termitas y se pueden encontrar en bacteriocitos especiales en bivalvos. Por otra parte, los miembros de fijación de nitrógeno de el orden de los rizobiales vive en nódulos de raíz, tales como alfalfa, frijoles, guisantes y soja, que proporcionan 20% de proteínas alimentarias en todo el mundo (Kuypers et al, 2018).

### 3.2.1 Fijación simbiótica de nitrógeno

Muchos microorganismos fijan el nitrógeno simbióticamente asociándose con una planta huésped. La planta proporciona azúcares de la fotosíntesis que son utilizados por el microorganismo fijador de nitrógeno para la energía que necesita para la fijación de nitrógeno. A cambio de estas fuentes de carbono, el microorganismo proporciona nitrógeno fijo a la planta huésped para su crecimiento (Wagner, 2011).

Las parejas simbióticas mayormente reconocidas son las asociaciones entre leguminosas y bacterias como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Las leguminosas usadas

en sistemas agrícolas son frijoles, cacahuete, soja y arvejas principalmente. De las leguminosas en la producción agrícola, la soja se cultiva en el 50% del área global dedicada a las leguminosas y representa el 68% de la producción total de leguminosas (Vance, 2001).

### 3.2.2 Fijación de nitrógeno asimbiótica

Bacterias heterotróficas presentes en el suelo son capaces de fijar niveles significativos de nitrógeno sin asociaciones con otros organismos. Como se ha indicado anteriormente, estos organismos deben encontrar su propia fuente de energía, típicamente oxidando moléculas orgánicas liberadas por otros organismos o de la descomposición. Hay algunos organismos de vida libre que tienen capacidades quimiolitotróficas y por lo tanto pueden utilizar compuestos inorgánicos como fuente de energía (Wagner, 2011).

Los microorganismos de vida libre que se encargan de llevar a cabo la de fijación de nitrógeno pueden ser anaerobios, aerobios o microaerófilos. Los microorganismos anaerobios presentan una ventaja sobre los demás, pues la enzima nitrogenasa es sensible al oxígeno y se puede inhibir en su presencia. Sin embargo, por razones como la escasez de carbono o fuente de energía para organismos con éstas características, su abundancia es menor al igual que su aporte a las tasas globales de fijación de nitrógeno (Wagner, 2011).

Entre las bacterias fijadoras de vida libre, las más numerosas son formas aeróbicas pertenecientes al género *Azotobacter*: *A. chroococcum* es la especie más abundante en suelos neutros y alcalinos, mientras que otras, como *Bijerinckia*, pueden ser dominantes en suelos ácidos. Entre las bacterias anaerobias destacan las de los géneros *Clostridium* y *Desulfovibrio*, y entre las facultativas más abundantes son *Bacillus* y *Klebsiella*, que, no obstante, sólo fijan nitrógeno en ausencia de oxígeno libre (Rodríguez et al., 1984).

### 3.3 Enzima nitrogenasa

La FBN es catalizada por una asociación enzimática llamada nitrogenasa, la cual ocasiona la ruptura del enlace de N<sub>2</sub> y la adición de tres átomos de hidrógeno a cada átomo de nitrógeno (Wagner, 2011). La misma está compuesta por dos proteínas solubles: la proteína del hierro (dinitrogenasa reductasa) y la proteína del MoFe

(dinitrogenasa). El MoFe es un cofactor esencial en la dinitrogenasa. Las dos enzimas del complejo funcionan conjuntamente: la dinitrogenasa reductasa reduce la dinitrogenasa, mientras que esta última reduce el nitrógeno. Ambas enzimas son necesarias para que se produzca la fijación.

Cada electrón transferido requiere 2 ATP. La nitrogenasa no es del todo efectiva. De hecho, también reduce otros compuestos como el H<sup>+</sup>, el N<sub>2</sub>O, el N<sup>-3</sup> y el CN. La producción de hidrógeno es un subproducto de la evolución de la enzima, particularmente en flujos de electrones poco elevados (Caffa & De Bernardin, 2006).

La enzima nitrogenasa es inhibida por la presencia en el ambiente de otras formas de nitrógeno (nitratos, nitritos y amonio) y por el oxígeno.

### 3.4 Bacterias psicrófilas

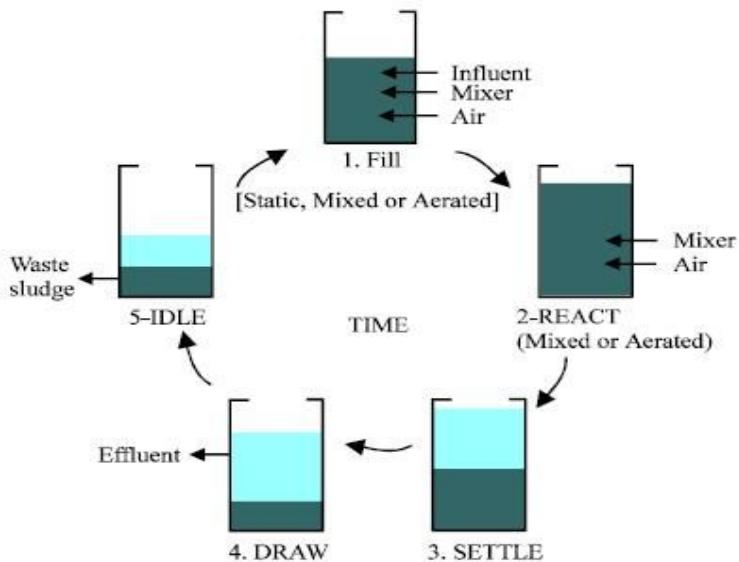
La palabra significa “amante al frío” y refiere a organismos adaptados para crecer a bajas temperaturas, teniendo un crecimiento óptimo por debajo de los 15° C, y un crecimiento máximo o limitado cerca de lo 20° C. También son conocidas como criófilas que son consideradas como extremófilas al aflorar en los lugares más fríos de la Tierra.

Cerca del 80% de la biosfera de la Tierra permanece constantemente entre los 5° C, ambientes ideales para los microorganismos psicrófilos en lugares tales como aguas oceánicas, glaciares, permafrost, campos de nieve y la Antártida. Dichos microorganismos son particularmente importantes para la ecología de los ambientes permanentemente fríos donde están inmersos dentro de distintos ensamblajes bacterianos. Estos varían según el nivel de requerimiento y tolerancia al oxígeno, alternando entre aerobios y anaerobios estrictos, y facultativos (Kelly, 2014).

### 3.5 Reactores secuenciales por lotes

Los reactores SBR (Sequential Batch Reactor) o reactores biológicos secuenciales se conocen hace aproximadamente 100 años, desde que Arden y Lockett publicaron en 1914 trabajos realizados en reactores a escala piloto, en ese tiempo llamados reactores de llenado y vaciado. Un SBR se puede comprender como un sistema de lodos activados pues los procesos unitarios que intervienen son similares. En ambos sistemas intervienen la mezcla, reacción y sedimentación, pero la diferencia importante es que en las plantas convencionales, los procesos se llevan a cabo

simultáneamente en tanques separados, mientras que en un sistema SBR los procesos tienen lugar en el mismo tanque (Muñoz & Ramos, 2014)



**Figura 1.** Reactor tipo SBR (Enviraj Consulting, 2018)

Estos reactores cuentan con cuatro etapas que son llevadas a cabo de manera secuencial: 1) etapa de llenado, para la adición de sustrato al reactor, 2) etapa de reacción, en la cual el reactor se somete o no a aireación dependiendo de las necesidades del tratamiento, 3) etapa de sedimentación que permite la separación de sólidos para lograr un sobrenadante clarificado como efluente y 4) etapa de vaciado, cuyo propósito es la extracción del efluente clarificado del reactor (Cárdenas et al, 2006).

### 3.6 Medio de cultivo

Un medio de cultivo es una preparación sólida o líquida empleada para cultivar, transportar y almacenar microorganismos. Para ser efectivo, el medio debe contener todos los nutrientes que el microorganismo necesita para multiplicarse (Jawetz et al, 2010). Los medios especializados son esenciales en el aislamiento y en la identificación de microorganismos, en ensayos de sensibilidad a antibióticos, análisis

de alimentos y de agua, microbiología industrial, y otras actividades. Aunque todos los microorganismos necesitan fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y varios minerales, la composición precisa de un medio satisfactorio dependerá de la especie que se desea cultivar, pues las necesidades nutricionales varían enormemente. El conocimiento del hábitat normal del microorganismo suele ser útil para seleccionar un medio de cultivo apropiado, ya que sus necesidades nutricionales son un reflejo de su entorno natural. Frecuentemente se usa un medio para seleccionar y cultivar microorganismos específicos o para ayudar en la identificación de una especie en particular, en estos casos, la función del medio también determinará su composición. Los medios de cultivo pueden clasificarse con base en varios parámetros: sus componentes químicos, su naturaleza física y su función (Castillo, 2013).

- Propiedades de los medios de cultivo:
  - Humedad: Indispensable para el crecimiento de microorganismos, su carencia (desecación) puede llevar a la muerte del microorganismo.
  - Fertilidad: Se refiere a los elementos o compuestos básicos que permite el crecimiento bacteriano.
  - pH: Se refiere a la basicidad o acidez óptimo para el desarrollo bacteriano óptimo, que es indispensable para el aislamiento; variaciones ácidas o alcalinas, pueden inhibir el crecimiento.
  - Transparencia: Permite la observación bacteriológica, evidenciar morfológica y físicamente su crecimiento en medios de cultivo adecuado (Rojas, 2011).

### 3.6.1 Agar Nutritivo

Es un medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales. Su uso está dirigido para el análisis de alimentos, aguas y materiales de importancia sanitaria.

Medio de cultivo no selectivo, está formado por peptona, extracto de carne bovina y agar. Esta fórmula relativamente sencilla proporciona los nutrientes necesarios para la multiplicación de un amplio número de microorganismos que no son necesariamente

exigentes. El extracto de carne bovina contiene sustancias solubles en agua incluidos los carbohidratos, vitaminas, compuestos de nitrógeno orgánicos y sales. Las peptonas son la fuente principal de nitrógeno orgánico, en particular aminoácidos y péptidos de cadena larga. El agar es el agente solidificante (BD, 2014). El agregado de cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante (Laboratorios Britania S.A., 2015).

Como limitaciones en el uso de éste medio de cultivo se tiene que para su identificación, los organismos deben encontrarse en un cultivo puro. Deben llevarse a cabo pruebas morfológicas, bioquímicas y/o serológicas para lograr una identificación final. Es importante consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados (BD, 2014).

### 3.6.2 Agar EMB

También llamado EAM (eosina y azul de metileno) es un medio selectivo y diferencial, usado para el aislamiento selectivo de bacilos gram negativos entéricos (*Enterobacteriaceae* y diversos otros bacilos gram negativos) de rápido desarrollo y con bajas o escasas exigencias nutricionales (Laboratorios Britania, 2015).

Contiene colorantes de azul de metileno y eosina, que inhiben las bacterias gram-positivas en cierto grado. Los colorantes también actúan como indicadores diferenciales en respuesta a la fermentación de la lactosa o la sacarosa por parte de los microorganismos. Los coliformes producen colonias de color negro azulado, mientras que las colonias de *Salmonella* y *Shigella* son incoloras o de color ámbar transparente. Las colonias de *Escherichia coli* pueden exhibir un brillo verde metálico característico debido a la rápida fermentación de la lactosa. El conjunto de medios de aislamiento de baja selectividad para *Salmonella* en muestras fecales y de otros tipos incluye el Agar EMB (con y sin sacarosa). Este medio puede inhibir el crecimiento de las bacterias gram-positivas como los estreptococos fecales, estafilococos y levaduras, o bien favorecer su crecimiento con formación de colonias puntiformes (BD, 2013).

### 3.6.3 Agar RBA

RBA es un medio sin amonio que se ha utilizado con éxito para el aislamiento, control de crecimiento y pureza de un amplio espectro de bacterias fijadoras de nitrógeno (DSMZ, 2007).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Obtener un consorcio microbiano capaz de fijar nitrógeno en reactores operados a temperatura de  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $28\pm2^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de nitratos y amonio, y biomasa producidos en reactores inoculados con lodo de PTAR de una industria papelera y suelo agrícola de clima frío operados a temperatura de  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $28\pm2^{\circ}\text{C}$ .
- Determinar la presencia de bacterias gram negativos y fijadoras de nitrógeno presentes en reactores inoculados con lodo de PTAR de industria papelera y suelo de clima templado operados a temperatura de  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $28\pm2^{\circ}\text{C}$ .
- Observar y describir diferencias entre los valores de nitratos, biomasa y amonio obtenidos a partir de reactores inoculados con lodo de PTAR de industria papelera y suelo de clima templado operados a temperatura de  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $28\pm2^{\circ}\text{C}$ .

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 MONTAJE EXPERIMENTAL Y VARIABLES DE CONTROL

#### 5.1.1 Ubicación del experimento

Los ensayos y pruebas de laboratorio fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología ambiental perteneciente a la Escuela de Ingeniería de los Recursos Naturales y del Ambiente (EIDENAR) de la Universidad del Valle.

#### 5.1.2 Montaje experimental

Se realizó el montaje de reactores tipo SBR (reactores secuenciales Batch), que consistieron en frascos de vidrio boeco tapa rosca azul de 1L, cuyo volumen útil fue de 800 mL. La unidad experimental operó con una proporción en volumen de sustrato RBA:inóculo de 3:1. Se montaron ocho reactores que fueron inoculados con las muestras de lodo de PTAR de papelera y suelo del municipio de Totoró en el Cauca. Cuatro de los reactores (lodo y suelo y sus respectivas réplicas) estuvieron a temperatura ambiente ( $28\pm2^{\circ}\text{C}$ ), y los otros cuatro (lodo y suelo y sus respectivas réplicas) estuvieron a temperatura baja ( $10\pm2^{\circ}\text{C}$ ) en condiciones de aireación con una bomba a un caudal de 1.2 L/min (LPM) lo que permitió la mezcla entre la biomasa y el medio líquido y la inyección de aire atmosférico al sistema.

Cada reactor, contó con una entrada (para suministro de aire) y dos salidas (para evacuación de gases y toma de muestras). Las condiciones de operación de los reactores durante esta fase experimental se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones de operación de los reactores

| Parámetro                            | Valor | Unidad |
|--------------------------------------|-------|--------|
| TRH (tiempo de retención hidráulico) | 48    | horas  |
| Volumen inóculo                      | 200   | mL     |
| Volumen sustrato                     | 600   | mL     |

|                          |                          |     |
|--------------------------|--------------------------|-----|
| Volumen útil del reactor | 800                      | mL  |
| Régimen del flujo        | Mezcla completa          | --- |
| Mecanismo de aireación   | Bomba con válvula cheque | --- |
| Tipo de aireación        | Difusores                | --- |
| Caudal de aireación      | 1.2                      | LPM |

Los reactores operaron como unidades SBR, lo que significa que cumplen 4 etapas importantes que son: llenado, reacción, sedimentación y retiro de sobrenadante. El tiempo de reacción (TRH) de los reactores fue de 48 horas. Se cumplen entonces dos etapas de operación de los reactores, una llamada enriquecimiento y la otra llamada operación.

## 5.2 MUESTRAS

### 5.2.1 Lodo de PTAR papelera:

La muestra de lodo se tomó de la laguna aireada de la PTAR de Planta I de Carvajal Pulpa y Papel, ubicada en el municipio de Yumbo (Valle). El municipio tiene una altitud media de 1021 msnm y una temperatura cercana a los 26°C. La temperatura de la muestra en la laguna aireada fue de 29°C. La muestra fue recolectada en dos recipientes plásticos de 4L el día 03 de Marzo del 2018, y fue conservada a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco en el Laboratorio de Docencia de Microbiología de la Universidad del Valle.

### 5.2.2 Suelo agrícola de baja temperatura - SABT:

La muestra de suelo se tomó de un cultivo de papa colorada en el corregimiento Gabriel López en el municipio de Totoró, departamento del Cauca. El municipio cuenta con una altitud media de 2750 msnm y temperatura que oscila entre los 9°C y los 18°C. La muestra se extrajo cerca de la raíz de una de las plantas del cultivo, y la

temperatura del suelo en la raíz del cultivo fue de 15°C. La muestra fue recolectada en dos bolsas tipo Ziploc el día 24 de Abril del 2018, fue transportada en nevera de icopor con el fin de conservar la cadena de frío, y se conservó en nevera durante diez días a una temperatura de 10±2°C.

### 5.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

#### 5.3.1. Variables observacionales

- Fuente de los microorganismos.
- Temperatura de adaptación para el enriquecimiento.

#### 5.3.2 Variables de control

- Fisicoquímicas

A lo largo de la fase experimental, se llevó a cabo un seguimiento de los reactores de las variables de control: pH y temperatura (Tabla 2)

**Tabla 2.** Técnica empleada el seguimiento de las variables de control

| Parámetro   | Unidades | Equipo utilizado                |
|-------------|----------|---------------------------------|
| pH          | Unidades | Electrodo de membrana de vidrio |
| Temperatura | °C       | Termómetro de mercurio          |

#### 5.3.3. Variables de respuesta

- Químicas

Inicialmente, cada 48 horas se realizó cuantificación de las formas de nitrógeno; las cuales fueron Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) que funcionan como variables de respuesta. Posteriormente la toma de muestras se cambió a una vez semanal. La Tabla 3 muestra la técnica empleada para cada medición.

**Tabla 3.** Técnica empleada para cuantificación de las formas de amonio

| <b>Forma de nitrógeno</b> | <b>Unidades</b>                   | <b>Técnica empleada</b>                       |
|---------------------------|-----------------------------------|---|
| Amonio                    | mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L | Titulación colorimétrica                      |
| Nitratos                  | mgNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L | Detección ultravioleta<br>espectrofotométrica |

Para el desarrollo de la técnica de titulación colorimétrica se realizó la medición de amonio por el método del fenato, estandarizado en el laboratorio de Microbiología Ambiental (Peralta et al., 2016). En la determinación de nitratos se hizo uso del protocolo establecido por el Standard Methods (2012).

El método de peso seco se utilizó para el seguimiento de la densidad poblacional (biomasa). A ésta técnica se le modificó el recipiente en el que se realiza la medición, se cambió el eppendorf de 2 mL por tubos de ensayo de 5 mL.

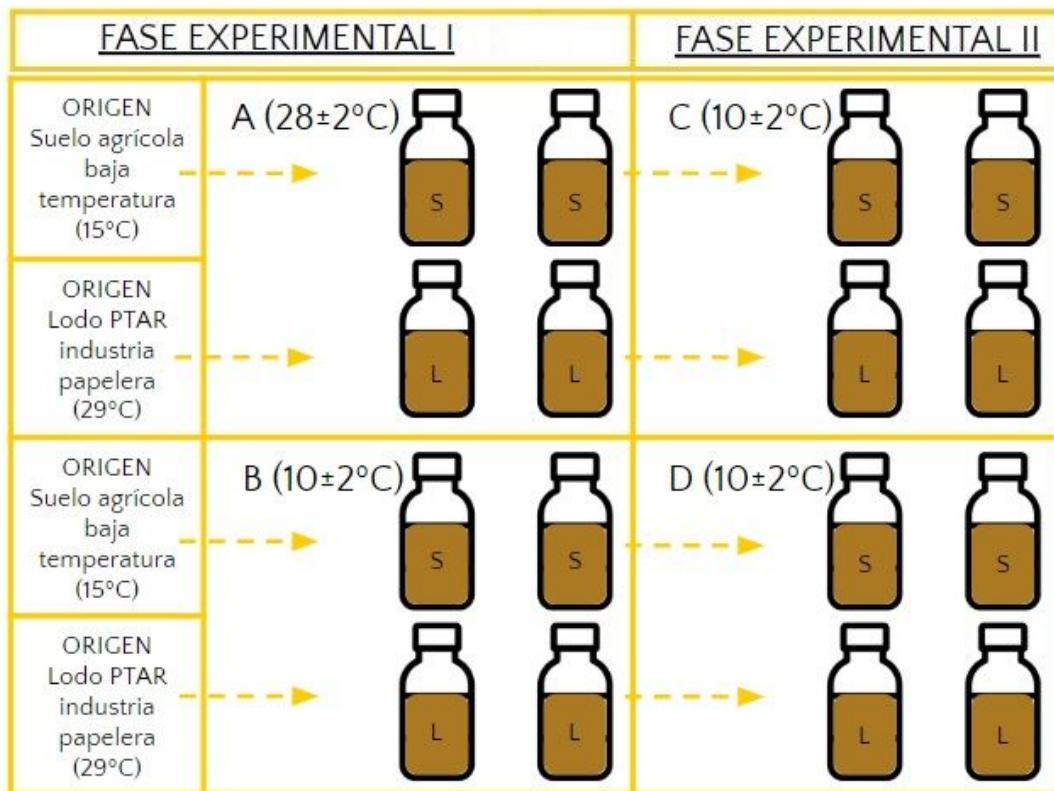
#### - Microbiológicas

Se realizó cuantificación de microorganismos cultivables de UFC/mL por el método de siembra en placas de petri. Para esto se seleccionaron tres medios: agar EMB, agar nutritivo y agar RBA. El agar nutritivo permite reconocer la abundancia microbiológica en las muestras de bacterias heterótrofas, el agar EMB es un medio selectivo y diferencial para enterobacterias, y el agar RBA modificado es un medio selectivo para bacterias fijadoras de nitrógeno (ver Anexo 4, Anexo 5, Anexo 6).

Todo el proceso de enriquecimiento se dividió en tres fases: inicio, medio y final, con la finalidad de observar la adaptación de población de microorganismos a diferentes rangos de temperatura.

## 6. FASE EXPERIMENTAL

El proceso realizado en laboratorio se dividió en dos fases experimentales, como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Esquema de Fase Experimental I y Fase Experimental II

A continuación se explica cada proceso llevado a cabo en la Fase Experimental I y Fase Experimental II.

### 6.1 FASE EXPERIMENTAL I

La fase de inicio se llevó a cabo durante 120 días, en esta fase los inóculos fueron alimentados con un medio específico para favorecer el crecimiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno. Ésta fase experimental arranca con dos reactores (inoculados con lodo PTAR papelera y suelo agrícola de baja temperatura con sus respectivas réplicas) a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$ . Y dos reactores (lodo y suelo con sus respectivas réplicas) a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$ .

( $28\pm2^{\circ}\text{C}$ ). El montaje experimental de los reactores en la Fase Experimental I se muestra en las imágenes 1 y 2.

Se realizó observación al microscopio de muestras frescas extraídas de los reactores cada 7 días (ver Anexo 7).



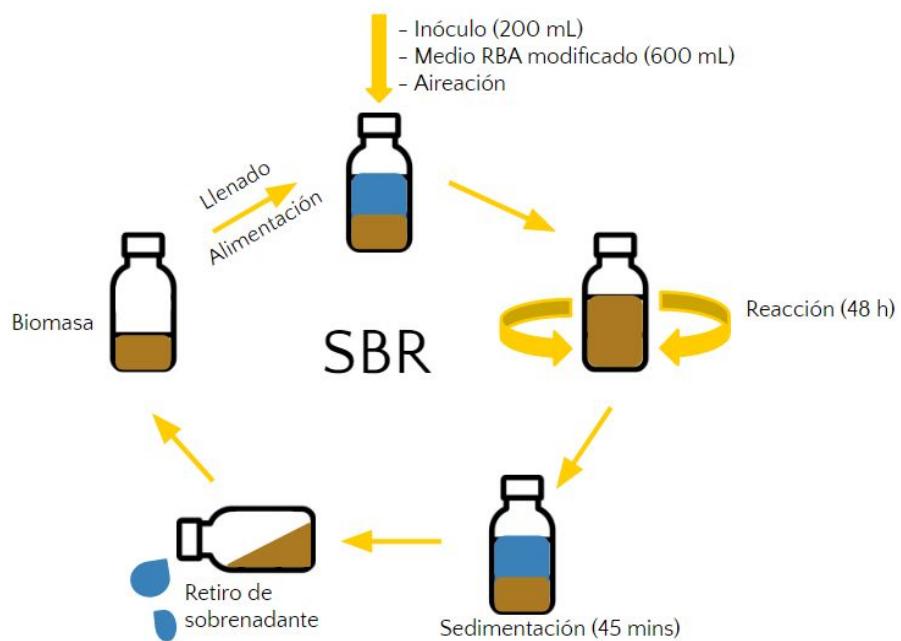
**Imagen 1.** Montaje fase experimental I a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$



**Imagen 2.** Montaje fase experimental I a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$

### 6.1.1 Operación de los reactores

Los reactores fueron operados como reactores biológicos secuenciales (SBR) en el que cada ciclo tuvo una duración promedio de 48 horas y estuvo conformado por 4 etapas; alimentación, reacción, sedimentación y vaciado. La toma de muestras de los reactores para análisis se hizo durante la reacción, previo al vaciado. Para lo cual se la agitó cada reactor para garantizar una mezcla completa y así la toma de una muestra representativa del reactor.



**Figura 3.** Enriquecimiento y reacción de reactores tipo SBR

#### 6.1.1.1 Alimentación

En la etapa de alimentación o llenado, los reactores se enriquecieron con el medio RBA (DSMZ, 2007) con algunas modificaciones, medio recomendado debido a que cuenta con diferentes fuentes de carbono que permiten una mayor recuperación de bacterias fijadoras (Asprilla, 2017). Éste medio se compone por dos soluciones llamadas Solución A y Solución B, las cuales se preparan por separado y se esterilizan de la misma manera. El enriquecimiento permite aumentar la densidad poblacional y

potenciar la fijación de nitrógeno por los microorganismos favorecidos, pues brinda una nutrición libre de nitrógeno que aporta la fuente de carbono, nutrientes necesarios para que la población lleve a cabo sus procesos. La composición para 1L del sustrato que se utilizó se muestra en la Tabla 4 y Tabla 5.

**Tabla 4.** Composición de Solución A del sustrato de los reactores (medio RBA modificado)

| Compuesto  | Cantidad | Unidad |
|--|----------|--------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0,1      | g      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 0,9      | g      |
| NaCl   | 0,1      | g      |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 0,1      | g      |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 0,1      | g      |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 0,005    | g      |
| MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O                 | 0,005    | g      |
| FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 0,01     | g      |
| Elementos traza (sol. SL-6*)                         | 3        | mL     |
| Agua destilada                                       | 950      | mL     |
| Agar (de ser necesario)                              | 15       | g      |

Sol. SL-6\*: Solución de elementos traza, se muestra en la Tabla 6

**Tabla 5.** Composición de Solución B del sustrato de los reactores (medio RBA modificado)

| Compuesto   | Cantidad | Unidad |
|-------------|----------|--------|
| Sacarosa    | 2        | g      |
| Na-piruvato | 1        | g      |

|                |    |    |
|----------------|----|----|
| D-Mannitol     | 2  | g  |
| D-Glucosa      | 2  | g  |
| Agua destilada | 50 | mL |

**Tabla 6.** Composición de Solución SL-6 (elementos traza de medio RBA)

| Compuesto  | Cantidad | Unidad |
|--|----------|--------|
| ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 0,1      | g      |
| MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O                | 0,03     | g      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 0,3      | g      |
| CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O                | 0,2      | g      |
| CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 0,01     | g      |
| NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O                | 0,02     | g      |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 0,03     | g      |
| Agua destilada                                       | 1000     | mL     |

#### 6.1.1.2 Reacción

Una vez se alimentó con el medio sintético, se mantuvo la aireación a cada uno de los reactores de 1.2 LPM de aire atmosférico, lo que facilita la mezcla (sustrato-biomasa), y la reacción de los microorganismos al interior del sistema con el nitrógeno molecular que ingresa debido a la aireación. Esta etapa tuvo una duración aproximada de 48 horas.

#### 6.1.1.3 Sedimentación

Durante esta etapa, se suspendió la aireación para permitir la separación de los sólidos (biomasa) del medio líquido y obtener el sobrenadante clarificado. Su duración aproximada fue de 1 hora.

#### 6.1.1.4 Vaciado

Posterior a la sedimentación, los reactores eran destapados y se les removió el sobrenadante clarificado. La duración de ésta actividad fue de aproximadamente 20 minutos.

### 6.2 FASE EXPERIMENTAL II

En ésta fase experimental, los reactores que cumplieron su proceso de adaptación y enriquecimiento a temperatura de  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  fueron llevados a temperatura de  $10\pm2^{\circ}\text{C}$ . Los demás reactores que estuvieron desde el tiempo 0 a  $28^{\circ}\text{C}$  se continúan alimentando en las mismas condiciones.

Lo anterior se realizó con la objetivo de observar las diferencias y comparar el comportamiento de los consorcios microbianos previamente aclimatados a la fijación de nitrógeno a una temperatura de  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  y llevarlo a una temperatura más baja o enriquecer bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) de un inóculo fresco directamente a una temperatura de  $10\pm2^{\circ}\text{C}$ . El montaje experimental de los reactores en la Fase Experimental II se muestra en la Imagen 3.



### **Imagen 3.** Montaje fase experimental II a 10±2°C

#### 6.2.1 Operación de los reactores

En la fase experimental II, los reactores se continuaron operando como reactores biológicos secuenciales (SBR) en el que cada ciclo tuvo una duración promedio de 48 horas y estuvo conformado por 4 etapas; alimentación, reacción, sedimentación y vaciado y éstas 4 etapas concuerdan con las etapas de la fase experimental I.

Los reactores se operaron a lo largo de las fases experimentales 1 y 2 aproximadamente 6 meses (190 días).

### 6.3 MÉTODO DE ANÁLISIS DE RESULTADOS

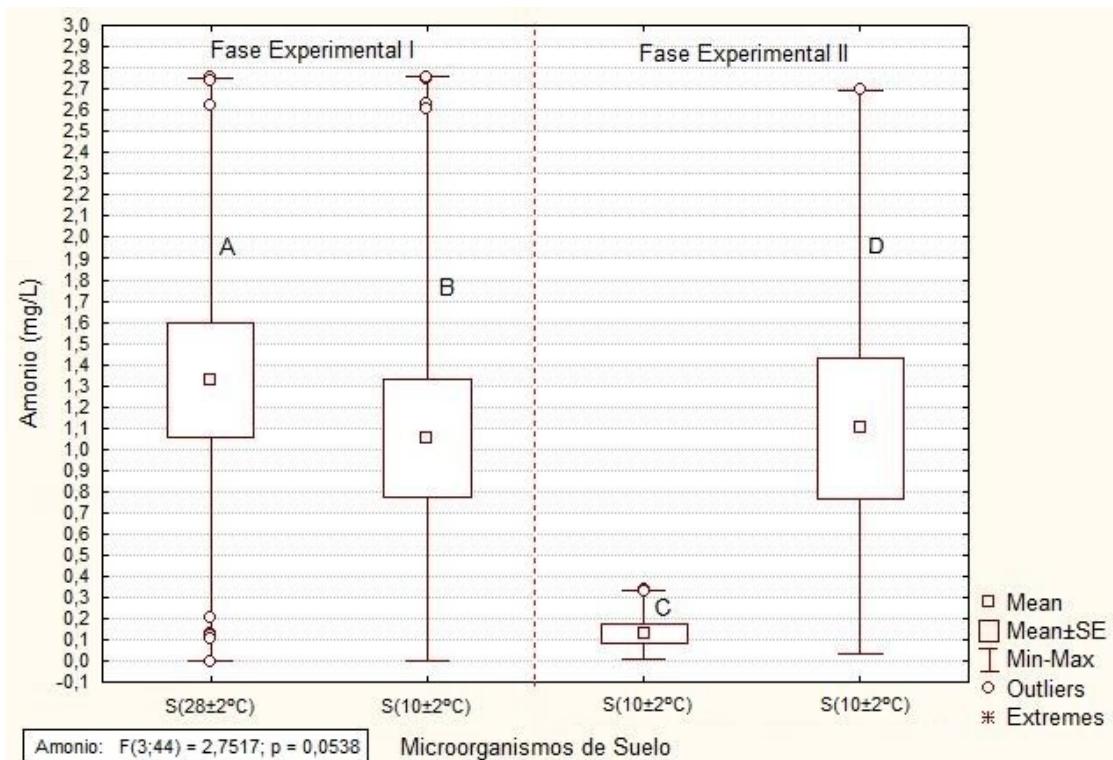
Se empleó la estadística descriptiva para el análisis de los resultados de las variables medidas en cada uno de los biorreactores, utilizando principalmente medidas de tendencia central y dispersión.

Se aplica un análisis de comparación de distribuciones mediante diagramas de cajas en la Fase Experimental I y Fase Experimental II usando como variables amonio, nitratos y biomasa, y el análisis de comparación de distribuciones mediante histogramas para la cuantificación microbiológica.

## 7. RESULTADOS

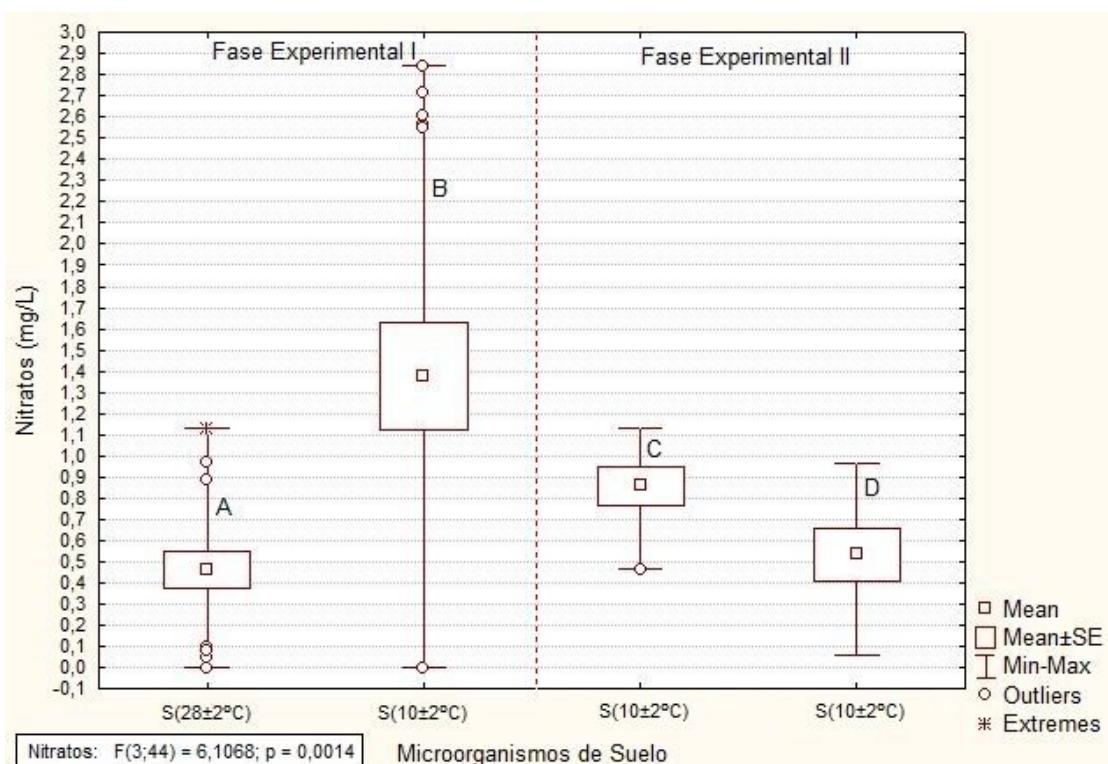
### 7.1 REACTORES INOCULADOS CON MICROORGANISMOS DE SUELO AGRÍCOLA DE BAJA TEMPERATURA

#### 7.1.1 Amonio



Como se muestra en la Gráfica 1, en la primera fase de adaptación se obtuvo una producción promedio de 1,35 mg/L (SA) y 1,05 mg/L (SB) de amonio para las temperaturas de  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Posterior a los 120 días de arranque y operación de los reactores, pasan a la Fase Experimental II, los reactores que iniciaron su adaptación a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  pasan a operarse a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  y los reactores que estuvieron a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  continúan su operación a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$ . En el lado derecho de la Gráfica 1 podemos observar los valores de concentración de amonio obtenidos en la Fase Experimental II donde los reactores que pasan a operarse de  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  presentan una disminución de cerca del 99% de producción de amonio con valores de 0,11 mg/L (SC). Las concentraciones de amonio en los reactores que continúan operándose a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  se mantienen cercanas con valores promedio de 1,1 mg/L (SD).

### 7.1.2 Nitratos

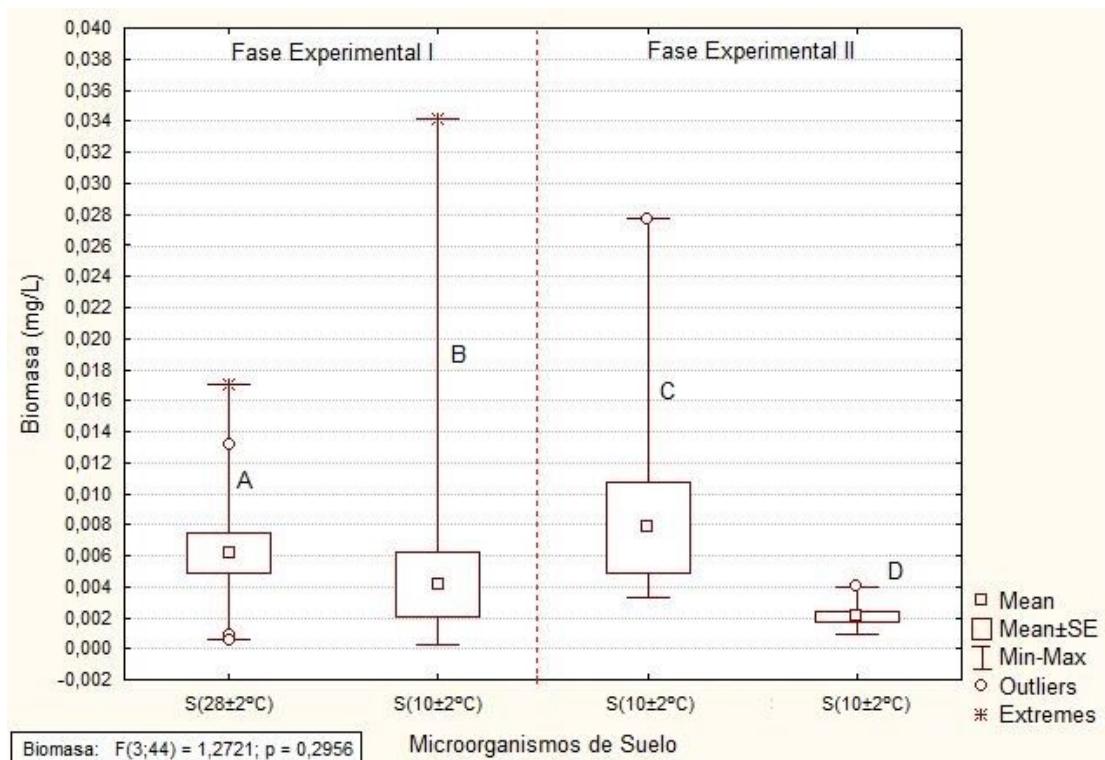


**Gráfica 2.** Concentración de nitratos producido por microorganismos del suelo adaptados a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$ . | Fase Experimental I: Microorganismos expuestos a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  (A) y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (B) durante 120 días. Fase Experimental II: Microorganismos a los que les disminuyó la temperatura a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  durante 70 días adicionales (C) y microorganismos que continuaron a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (D). (S): suelo. El cuadro pequeño representa la media estadística de los resultados, la caja grande en el diagrama es el error estándar sumado a la media. Los bigotes representan los valores

máximos (parte superior de la caja) y mínimos (parte inferior de la caja). Los círculos en las partes extremas de los bigotes representan los valores atípicos y los puntos rojos son los extremos.

En la Gráfica 2 se evidencia que para la primera fase de adaptación se obtuvo una producción promedio de 0,45 mg/L y 1,4 mg/L de nitratos para SA y SB respectivamente. Una vez pasan a la Fase Experimental II, cumplidos 120 días del arranque y operación de los reactores, se puede observar en el lado derecho de la Gráfica 2 que los valores de concentración de nitratos obtenidos en la Fase Experimental II a 10±2°C presentan un aumento que dobla la el valor de nitratos obtenidos anteriormente, registrando 0,9 mg/L en SC. Las concentraciones de nitratos en los reactores SD disminuyen sus valores iniciales obtenidos en cerca de un 68%, presentando valores de 0,55 mg/L.

### 7.1.3 Biomasa

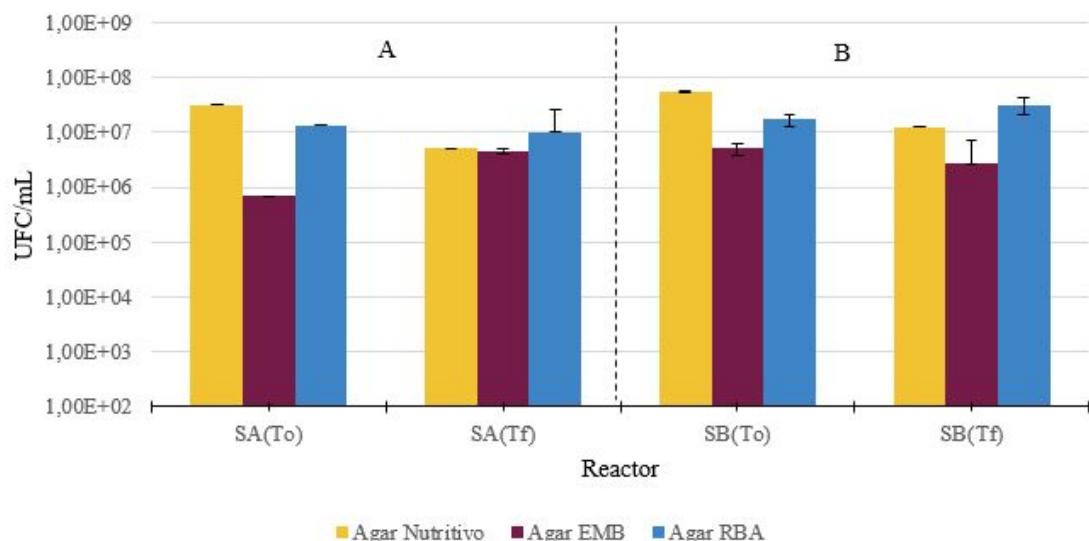


**Gráfica 3.** Concentración de biomasa producida por microorganismos del suelo adaptados a 28±2°C y 10±2°C. | Fase Experimental I: Microorganismos expuestos a 28±2°C (A) y 10±2°C (B) durante 120 días. Fase Experimental II: Microorganismos a los que les disminuyó la temperatura a 10±2°C durante 70 días adicionales (C) y

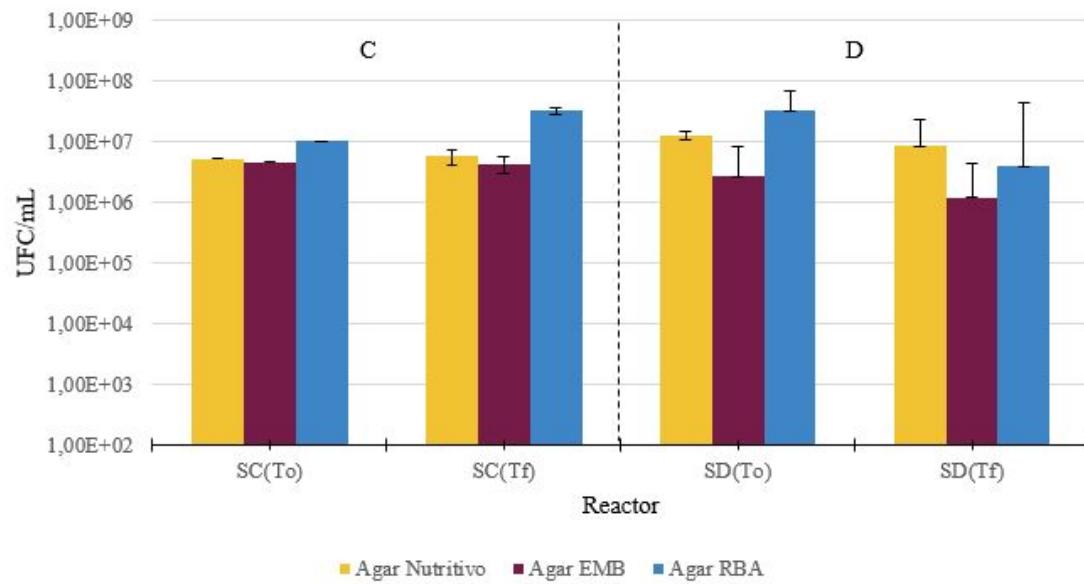
microorganismos que continuaron a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (D). (S): suelo. El caja pequeña representa la media estadística de los resultados, la caja grande en el diagrama es el error estándar sumado a la media. Los bigotes representan los valores máximos (parte superior de la caja) y mínimos (parte inferior de la caja). Los círculos en las partes extremas de los bigotes representan los valores atípicos y los puntos rojos son los extremos.

Como se evidencia en la Gráfica 3, en la Fase Experimental I se obtuvo una concentración promedio de biomasa de  $0,006 \text{ mg/L}$  y  $0,004 \text{ mg/L}$  para SA y SB. Se puede observar en el lado derecho de la misma gráfica que la concentración de biomasa en SC y SD es de  $0,008 \text{ mg/L}$  y  $0,002 \text{ mg/L}$  respectivamente.

#### 7.1.4 Recuento en placa



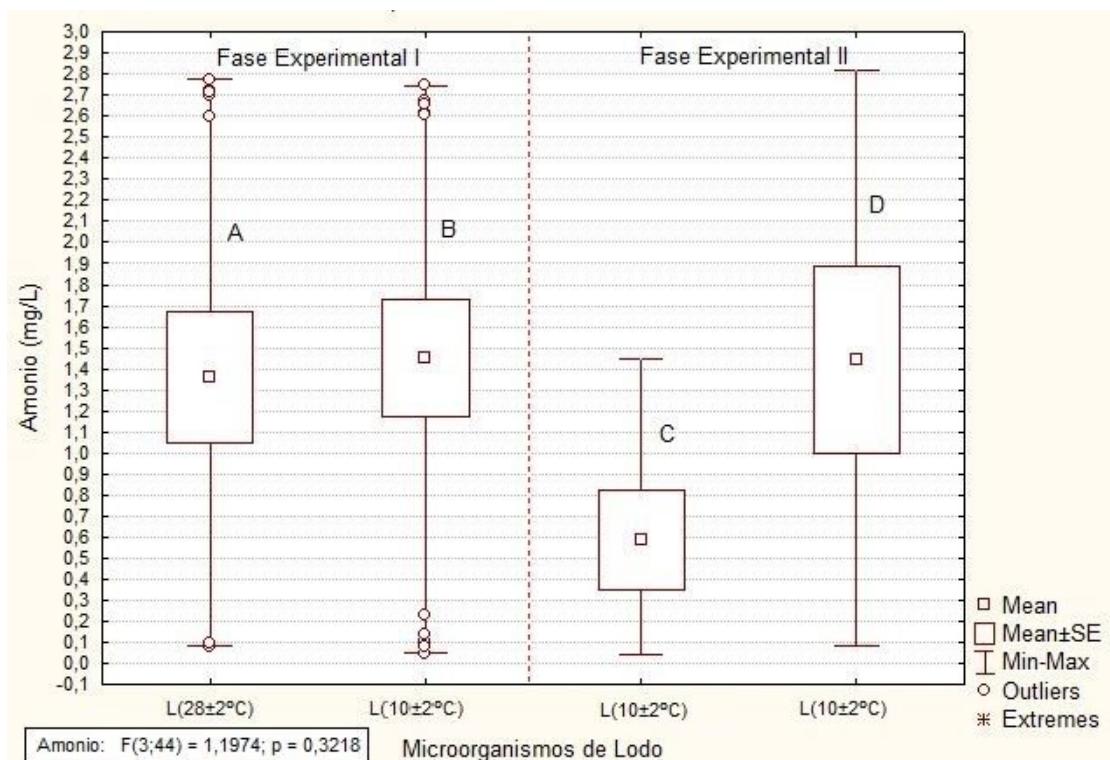
**Gráfica 4.** Recuentos en placa de reactores inoculados con microorganismos del suelo adaptados a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  Fase Experimental I. | Microorganismos expuestos a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  (A) y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (B) durante 120 días. En el eje X están los resultados de los reactores de acuerdo al tipo de inóculo microbiano utilizado (S): suelo, en los tiempos (To) tiempo 0 y (Tf). En el eje Y se encuentra la escala logarítmica de UFC/mL (unidades formadoras de colonia en mililitro de muestra). La barras representan los resultados de los recuentos en placa en los medios de cultivo Agar Nutritivo (amarillo), Agar EMB (rojo) y Agar RBA (azul). Las barras de error indican la DE entre duplicados.



**Gráfica 5.** Recuentos en placa de reactores inoculados con microorganismos del suelo enriquecidos y operados a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  Fase Experimental II. | Microorganismos expuestos a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (C) y (D) durante 70 días posteriores a la finalización de la Fase Experimental I. En el eje X están los resultados de los reactores de acuerdo al tipo de inóculo microbiano utilizado (S): suelo, en los tiempos (To) tiempo 0 y (Tf). En el eje Y se encuentra la escala logarítmica de UFC/mL (unidades formadoras de colonia en mililitro de muestra). La barras representan los resultados de los recuentos en placa en los medios de cultivo Agar Nutritivo (amarillo), Agar EMB (rojo) y Agar RBA (azul). Las barras de error indican la DE entre duplicados.

## 7.2 REACTORES INOCULADOS CON MICROORGANISMOS DE LODO DE PTAR DE INDUSTRIA PAPELERA

### 7.2.1 Amonio

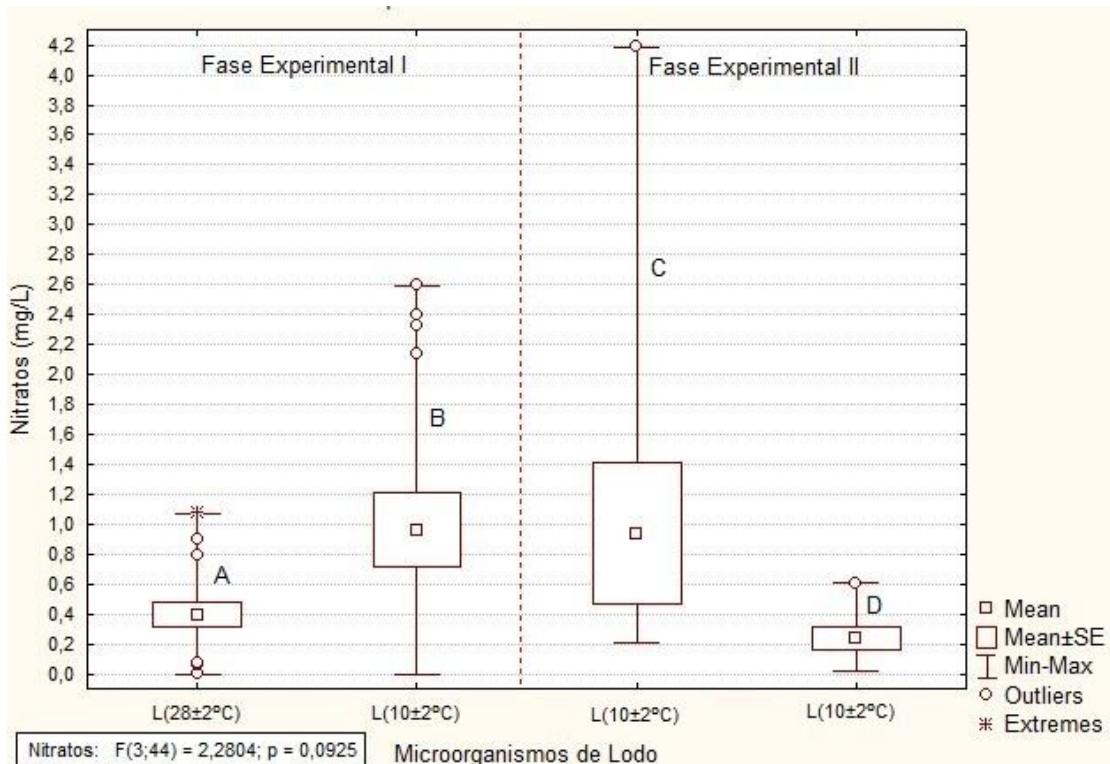


**Gráfica 6.** Concentración de amonio producido por microorganismos de lodo adaptados a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$ . | Fase Experimental I: Microorganismos expuestos a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  (A) y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (B) durante 120 días. Fase Experimental II: Microorganismos a los que les disminuyó la temperatura a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  durante 70 días adicionales (C) y microorganismos que continuaron a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (D). (L): lodo. El cuadro pequeño representa la media estadística de los resultados, la caja grande en el diagrama es el error estándar sumado a la media. Los bigotes representan los valores máximos (parte superior de la caja) y mínimos (parte inferior de la caja). Los círculos en las partes extremas de los bigotes representan los valores atípicos y los puntos rojos son los extremos.

Como se puede observar en la Gráfica 6, en la primera fase de adaptación de los microorganismos se obtuvo una producción promedio de amonio de 1,35 mg/L (LA) y 1,45 mg/L (LB) a temperaturas de  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  respectivamente. En el lado derecho de la Gráfica 6 podemos observar los valores de concentración de amonio obtenidos en la Fase Experimental II donde los reactores LC presentan una disminución de más de la mitad de los valores de concentración de amonio obtenidos

en la anterior fase, los registros disminuyen cerca del 56% con valores de 0,6 mg/L. Las concentraciones de amonio en los reactores que continúan operándose a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  se mantienen con la misma tendencia, cercanas con valores promedio de 1,45 mg/L (LD).

### 7.2.2 Nitratos

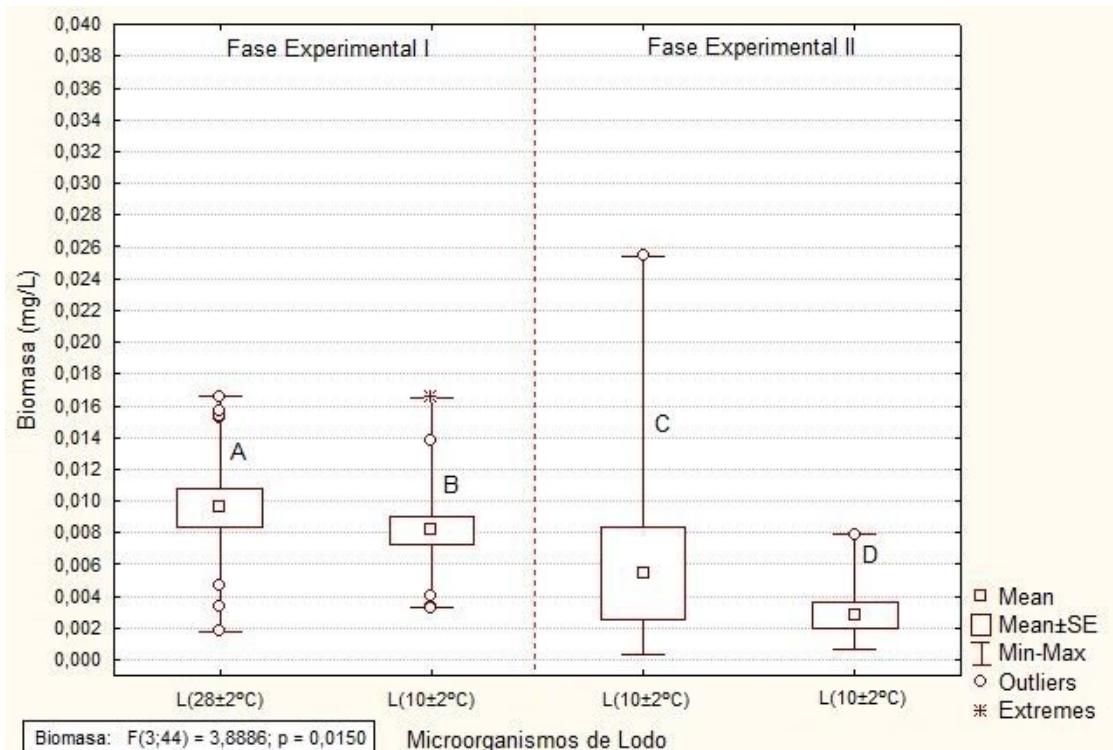


**Gráfica 7.** Concentración de nitratos producido por microorganismos de lodo adaptados a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$ . | Fase Experimental I: Microorganismos expuestos a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  (A) y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (B) durante 120 días. Fase Experimental II: Microorganismos a los que les disminuyó la temperatura a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  durante 70 días adicionales (C) y microorganismos que continuaron a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (D). (L): lodo. El caja pequeña representa la media estadística de los resultados, la caja grande en el diagrama es el error estándar sumado a la media. Los bigotes representan los valores máximos (parte superior de la caja) y mínimos (parte inferior de la caja). Los círculos en las partes extremas de los bigotes representan los valores atípicos y los puntos rojos son los extremos.

En la Gráfica 7 se evidencia que para la primera fase de adaptación se obtuvo una producción promedio de 0,4 mg/L y 0,9 mg/L de nitratos para LA y LB respectivamente. Se puede observar en el lado derecho de la Gráfica 7 que los valores de concentración de nitratos obtenidos en la Fase Experimental II presentan un

aumento que dobla la el valor de nitratos obtenidos anteriormente, registrando 0,9 mg/L para el caso de LC. Las concentraciones de nitratos en los reactores LD disminuyen sus valores iniciales obtenidos en cerca de un 80%, presentando valores de 0,2 mg/.

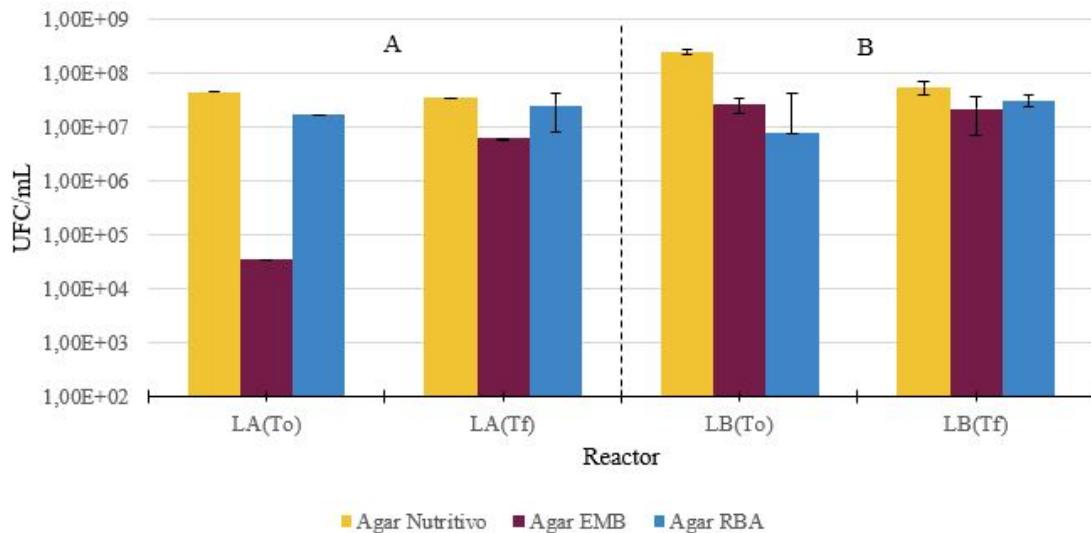
### 7.2.3 Biomasa



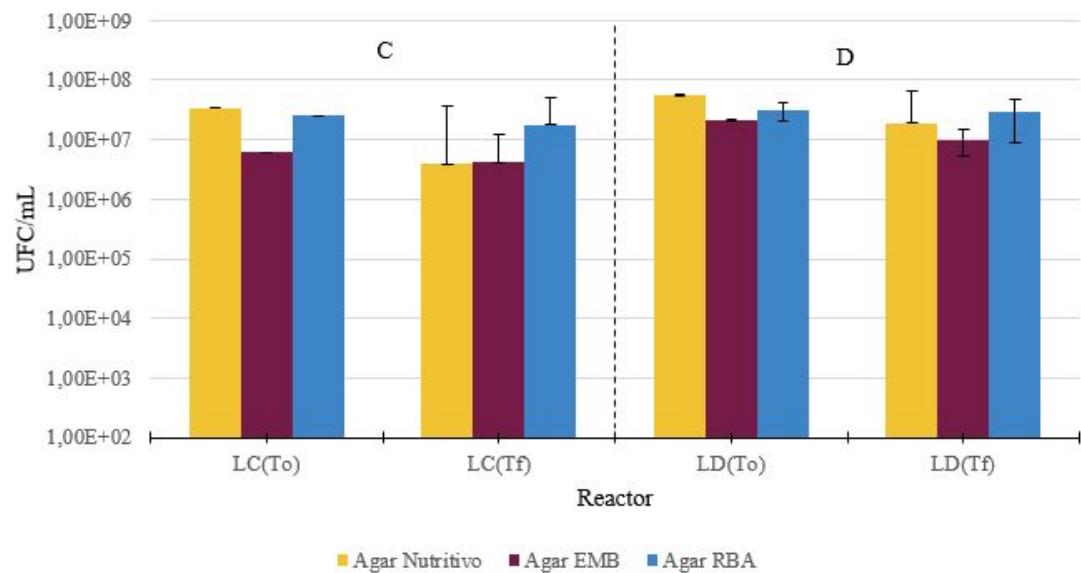
**Gráfica 8.** Concentración de biomasa producida por microorganismos de lodo adaptados a  $28\pm2^\circ\text{C}$  y  $10\pm2^\circ\text{C}$ . | Fase Experimental I: Microorganismos expuestos a  $28\pm2^\circ\text{C}$  (A) y  $10\pm2^\circ\text{C}$  (B) durante 120 días. Fase Experimental II: Microorganismos a los que les disminuyó la temperatura a  $10\pm2^\circ\text{C}$  durante 70 días adicionales (C) y microorganismos que continuaron a  $10\pm2^\circ\text{C}$  (D). (L): lodo. El caja pequeña representa la media estadística de los resultados, la caja grande en el diagrama es el error estándar sumado a la media. Los bigotes representan los valores máximos (parte superior de la caja) y mínimos (parte inferior de la caja). Los círculos en las partes extremas de los bigotes representan los valores atípicos y los puntos rojos son los extremos.

Como se evidencia en la Gráfica 8, en la Fase Experimental I se obtuvo una concentración promedio de biomasa de de 0,009 mg/L y 0,008 mg/L para LA y LB. Se puede observar en el lado derecho de la misma gráfica que la concentración de biomasa en LC y LD es de 0,006 mg/L y 0,003 mg/L respectivamente.

#### 7.2.4 Recuento en placa



**Gráfica 9.** Recuentos en placa de reactores inoculados con microorganismos de lodo adaptados a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  Fase Experimental I. | Microorganismos expuestos a  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  (A) y  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (B) durante 120 días. En el eje X están los resultados de los reactores de acuerdo al tipo de inóculo microbiano utilizado (L): lodo, en los tiempos (To) tiempo 0 y (Tf). En el eje Y se encuentra la escala logarítmica de UFC/mL (unidades formadoras de colonia en mililitro de muestra). La barras representan los resultados de los recuentos en placa en los medios de cultivo Agar Nutritivo (amarillo), Agar EMB (rojo) y Agar RBA (azul). Las barras de error indican la DE entre duplicados.



**Gráfica 10.** Recuentos en placa de reactores inoculados con microorganismos de lodo enriquecidos y operados a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  Fase Experimental II. | Microorganismos expuestos a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  (C) y (D) durante 70 días posteriores a la finalización de la Fase Experimental I. En el eje X están los resultados de los reactores de acuerdo al tipo de inóculo microbiano utilizado (L): lodo, en los tiempos (To) tiempo 0 y (Tf). En el eje Y se encuentra la escala logarítmica de UFC/mL (unidades formadoras de colonia en mililitro de muestra). La barras representan los resultados de los recuentos en placa en los medios de cultivo Agar Nutritivo (amarillo), Agar EMB (rojo) y Agar RBA (azul). Las barras de error indican la DE entre duplicados.

## 8. DISCUSIÓN

### - Amonio

De acuerdo a los resultados obtenidos en las dos fases, para SA y SC, y LA y LC, en la Gráfica 1 y Gráfica 6, donde se evidencia disminución de cerca del 99% y 60% (0,1 mg/L y 0,6 mg/L) respectivamente, de amonio, se puede explicar con los procesos adaptativos que sufren los microorganismos cuando son sometidos a cambios. La temperatura es uno de los principales factores que determina la cinética de crecimiento microbiana, dado que altera diversas funciones vitales. Entre las actividades afectadas están la velocidad de las reacciones químicas, cambios en la estructura y actividad de las macromoléculas, las funciones asociadas a la membrana y la actividad enzimática pues a medida que la temperatura aumenta se incrementa la energía cinética de las moléculas aumentando la velocidad de las reacciones. En cambio, las bajas temperaturas afectan los procesos fisiológicos disminuyendo la velocidad de las reacciones enzimáticas (Fernández et al, 2006). Con lo anterior, se puede concluir que con el cambio de temperatura de  $28\pm2^{\circ}\text{C}$  a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  disminuye la actividad enzimática de la nitrogenasa en los microorganismos tanto de suelo como de lodo de PTAR de industria papelera. Se ha demostrado que la actividad del complejo enzimático nitrogenasa aumenta en el rango de temperatura  $21\text{--}39^{\circ}\text{C}$  (Stal, 2017). Éste mismo efecto ocurre en si se observan comparativamente los valores de amonio en SA y SB, donde se obtuvieron concentraciones de 1,35 mg/L y 1,05 mg/L respectivamente.

Si se analiza SD y LD en la Gráfica 1 y Gráfica 6, comparando con los registros de amonio de la Fase Experimental I, los valores de amonio se conserven en reactores que han sido sometidos a la misma temperatura de  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  desde su arranque, y continúen en aumento lo que indica es que existió un proceso adaptativo de los microorganismos en los reactores (tanto de suelo como de lodo), donde la enzima nitrogenasa aunque presenta una mayor actividad a temperaturas mayores (Stal, 2017), logra adaptarse a las condiciones de  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  y continuar el proceso de fijación de nitrógeno molecular. Como se describe anteriormente, la temperatura es un factor que afecta la cinética de una reacción química. A bajas temperaturas, la capacidad de reacción del oxígeno en el agua disminuye, lo que favorece la fijación de nitrógeno debido a que el complejo enzimático nitrogenasa responsable de este proceso es

sensible al O<sub>2</sub>(Soto et al, 2001), y lo que ocurre ante la presencia de oxígeno es una inactivación de la enzima (Espín, 2007).

- Nitratos

Por otro lado, de acuerdo con los registros de nitratos, los valores de concentración de nitratos para SA y SC, y LA y LC, en la Gráfica 2 y Gráfica 7, ambos presentan variaciones en las concentraciones de nitratos. Los inóculos presentan un aumento en la concentración de nitratos en el sistema de un poco más del doble de sus valores iniciales de concentración (SA y LA), obteniendo 0,9 mg/L de concentración de nitratos. Existen otras bacterias del ciclo de nitrógeno en los reactores, pues una vez finaliza la Fase Experimental I a los 120 días de arranque de los reactores, hay amonio disponible que es sintetizado por bacterias nitrificantes y es convertido a nitritos y nitratos en la Fase Experimental II de manera más rápida de lo que se fija nitrógeno en forma de N amoniacal. Como indica Avendaño (2011), la temperatura es el factor operacional más influyente en el crecimiento de las bacterias nitrificantes, donde, la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes aumenta considerablemente con la temperatura en el rango de 8°C a 30°C (Avendaño, 2011).

El aumento de concentraciones de nitratos está relacionado con el mecanismo de transferencia de oxígeno. Se ha encontrado que la formación de nitrato en los reactores tipo batch y su producción puede estar favorecida por el aumento oxígeno disuelto en los reactores debido al mecanismo de aireación. El oxígeno es un gas cristalino que se dispersa en una masa líquida a través de la interfase gas-líquido. Este concepto de la película doble, compuesta de una película fina de gas y una película de líquido en la interfase. El proceso de transferencia de oxígeno ha sido descrito como un fenómeno que ocurre en tres etapas: en la primera, las moléculas de gas son transferidas a la superficie del líquido, resultando en condiciones de saturación o de equilibrio en la interfase. La velocidad de transferencia es muy rápida y la película de gas-líquido es muy fina, estimada de, por lo menos, tres moléculas de espesor. En la segunda etapa las moléculas de oxígeno atraviesan esta película por difusión molecular. En la tercera, el oxígeno se dispersa en el líquido por difusión y convección (Yáñez, 2000).

El sistema de aireación artificial usado en los reactores SBR se garantizó por el mecanismo de difusión de aire comprimido con difusores de burbuja fina. La temperatura afecta de manera directa a la solubilidad (concentración de oxígeno

disuelto en el líquido en el equilibrio) y la difusividad del oxígeno en el líquido, y así, la temperatura afecta la velocidad de transferencia de oxígeno (García, 2010) De éste modo, la densidad del agua varía según la temperatura, donde para 10°C presenta una densidad de 999,77 kg/m<sup>3</sup> y para 28°C 996,31 kg/m<sup>3</sup>, y según García (2010), es más probable que un incremento en la temperatura promueva un incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno debido a que se aumenta la difusividad de éste (García, 2010).

La transferencia de oxígeno a 28°C presenta una mayor velocidad, pero de la misma manera el oxígeno se pierde del sistema en los reactores, contrario a lo que ocurre a 10°C donde el mecanismo de transferencia de oxígeno ocurre pero como la densidad del agua es mayor, el oxígeno tiene un mayor tiempo de residencia en los reactores antes de liberarse, lo que significa que hay una mayor disponibilidad de oxígeno que favorece la nitrificación, en la que ocurren reacciones bioquímicas de oxidación de amonio y oxidación de nitrito para la obtención de nitratos (Claros, 2012).

Las variaciones de concentración de nitratos entre SA y SB, y SB y SD en la Gráfica 2, y la variaciones entre LA y LB, y LB y LD en la Gráfica 7 se explican con la baja capacidad de reacción del oxígeno a bajas temperaturas que brinda al sistema condiciones de anaerobiosis que fomenta la fijación biológica de nitrógeno por la actividad de la enzima nitrogenasa y la disminución de nitrificación por ausencia de oxidación de amonio y nitratos.

#### - Biomasa

Los valores de concentración de biomasa en la Gráfica 3, observando que el valor  $p=0,2956$  se puede concluir que no hay cambios significativos entre los resultados de biomasa en SA, SB, SC y SD, dado que el valor  $p$  es mayor a 0,005. Esto mismo ocurre si se observan por separado los valores de biomasa para el caso de L, donde se tiene un  $p$  de 0,3501 para LA y LB, y un  $p=4037$  en el caso de LC y LD . De acuerdo a las Gráficas 3 y 4, se pueden evidenciar bajas concentraciones de biomasa en sistemas inoculados con microorganismos de suelo y lodo, sin embargo, se puede indicar que las bacterias presentes en estos reactores funcionan de forma similar a otro tipo de microorganismos, como es el caso de las levaduras, las cuales una vez su proceso de crecimiento se detiene cambian su metabolismo que se traduce en una menor formación de cantidad de biomasa y una mayor producción de alcohol

(Gutiérrez, 2007). En el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno y las nitrificantes en los reactores de éste trabajo, no existen condiciones óptimas para la formación de biomasa en grandes concentraciones, pero las bacterias cambian su metabolismo deteniendo el crecimiento poblacional pero llevando a cabo procesos de fijación de nitrógeno y nitrificación.

- Recuento en placa

Los resultados obtenidos en las Gráficas 4, 5, 9 y 10 correspondiente a la cuantificación de microorganismos cultivables de UFC/mL por el método de siembra en placas de petri, como método de medición de variable microbiológica del estudio, no evidencia lo ocurrido en los reactores que fueron inoculados para el presente trabajo. Como explica Welz, et al (2018) sobre cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno utilizando técnicas dependientes del cultivo, se encuentra una notable diferencia en la técnica de recuento (UFC/ml) comparativamente con otras técnicas de cuantificación de bacterias, y a la vez en la misma técnica, donde las unidades de expresión no son las mismas y su utilidad es para una aproximación a la realidad (Welz et al, 2018).

## 9. CONCLUSIONES

Se puede afirmar que usando el medio libre de nitrógeno RBA como sustrato, dos grupos de microorganismos de distintas naturalezas que inician su proceso adaptativo a la fijación de nitrógeno y el enriquecimiento de las bacterias fijadoras a una temperatura seleccionada en reactores tipo SBR, bajo las mismas condiciones para ambos grupos de microorganismos, obtendrán comportamientos similares de fijación de nitrógeno traducida en concentración de amonio, nitrificación con las concentraciones de nitratos y biomasa. Adicionalmente, se obtuvieron a  $10\pm2^{\circ}\text{C}$  consorcios microbianos capaces de fijar nitrógeno en reactores bajo las condiciones de enriquecimiento y operación mencionadas.

Aunque las bacterias nitrificantes no fueron las de interés en éste trabajo, se puede asegurar, con los resultados, que hay presencia de éstas en los reactores que fueron operados. También se puede destacar que la asimilación del amoníaco es un proceso rápido, por lo tanto, se consumirá rápidamente para éste caso por otro grupo de bacterias del ciclo del nitrógeno una vez que sea fijado. A la vez se puede estar en concordancia con Slade (2001) que indica que incluso una parte del nitrógeno fijado se puede excretar y solo una pequeña cantidad es amonio (Slade et al., 2001), y todo lo anterior explicaría el aumento de concentraciones más altas de nitratos en los reactores.

Con la selección del lodo de PTAR de papelera se refuerza los estudios en los que se destaca que en el tratamiento de aguas residuales como el caso de los lodos activados, se tienen cantidades limitadas de nitrógeno y fósforo, por lo tanto, estos nutrientes se agregan como un suplemento para lograr y un rendimiento estable de la eliminación de DBO en los tratamientos biológicos con activación lodo, que funcionan con la adición de nitrógeno a las plantas de tratamiento pero se traducen en un costo significativo para las industrias. Sin embargo, el funcionamiento de algunas plantas de tratamiento sin la adición de ningún suplemento, el nitrógeno se explica por la existencia de un proceso bacteriano natural que se llama fijación biológica de nitrógeno, y es un proceso que ocurre especialmente en plantas de tratamiento de

aguas residuales de industrias de pulpa y papel, por lo que el lodo de una PTAR de una industria de tales características tiene un valor agregado (Ospina, 2017).

Una de los principales intereses en el proceso de observación al microscopio (ver Anexo 7) fue mirar morfologías de muestras frescas extraídas de cada uno de los reactores de manera semanal y determinar por morfología, color, movilidad y tipo de agrupación a qué tipo de microorganismo era correspondiente. En las muestras se observaron bacterias, algas, quistes, pero en las observaciones semanales se empezó a evidenciar más a menudo la presencia de protozoos en los reactores, lo que constituía una amenaza para las bacterias de interés (BFN) pues uno de sus principales alimentos son las bacterias. Para la erradicación de los protozoos, los reactores fueron aireados con CO<sub>2</sub> por 48 horas (ver Anexo 8). La inyección de CO<sub>2</sub> al sistema ocasionó un tipo de estrés sobre los protozoos causando la hinchazón y el alargamiento de los mismos hasta la desaparición de los mismos. Se puede entonces catalogar como un método para la eliminación de protozoos útil para casos en los que no se puede adicionar antibióticos o antiparasitarios que pueden ocasionar cambios en la ecología microbiana del sistema.

## 10. RECOMENDACIONES

Se puede sugerir que la inoculación, operación y enriquecimiento con medio RBA de reactores tipo SBR con fines de fijación biológica de nitrógeno arrojará mayores resultados en términos de concentración de amonio a temperaturas menores que la del clima tropical ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ).

Exponer reactores a enriquecimiento y operación en bajas temperaturas propicia la fijación biológica de nitrógeno por disminución de capacidad de reacción de oxígeno en los reactores que se traduce en ausencia de oxígeno, ideal para la activación de la enzima nitrogenasa y un mecanismo de inactivación del proceso de nitrificación. De ésta manera inóculos adaptados a la fijación de nitrógeno a bajas temperaturas afianzan la posibilidad de uso como biofertilizante para cultivos con tales condiciones climáticas. Los microorganismos enriquecidos a temperatura de  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  deben ser probados en ambientes reales para verificar la capacidad y posibilidad que tienen para ser usados como biofertilizantes que contribuyan con la disminución del uso de fertilizantes químicos y la recuperación de suelos que han sido de uso agrícola extensivo.

Con los resultados obtenidos en el en el presente trabajo de investigación, sería de interés inocular, enriquecer y operar reactores con los protocolos usados en el grupo de investigación GAOX a temperaturas menores a  $10^{\circ}\text{C}$ , con fines de observar el proceso adaptativo de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) en esas temperaturas y obtener un consorcio que sea posiblemente usado como una estrategia de biofertilización en lugares de temperaturas muy bajas, o de estaciones, como es el caso de países europeos y norteamericanos, y por otro lado, observar si el proceso de fijación de nitrógeno sigue comportamientos similares como se observa en el presente trabajo.

Se recomienda realizar trabajos de investigación en colaboración con países que presenten intereses por la fijación biológica de nitrógeno a bajas temperaturas, y así realizar procesos comparativos de resultados obtenidos para inóculos adaptados y enriquecidos con fines de FBN en Colombia y en países europeos y/o norteamericanos.

## 11. REFERENCIAS

- Arroyo, A. F. (2017). Producción de amonio y biomasa activa a partir de consorcios microbianos provenientes de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas. Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- Asprilla, P. A. (2017). Análisis de composición y distribución de bacterias fijadoras de nitrógeno en ecosistemas del Valle del Cauca. Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- Avendaño, L. M. (2011) Estudio de la población de bacterias nitrificantes y su relación con los parámetros físico-químicos, biológicos y operacionales en una EDAR con sistema convencional de Fangos Activos. Máster en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- BD Becton, Dickinson & Company (2013). BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. Instrucciones de uso - Medio en placas listo para su uso. United States of America.
- BD Becton, Dickinson and Company (2014). BBL Nutrient Agar. Rev. 10. United States of America.
- Baca, B. Soto, L. & Pardo, M. (2000) Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos: Ciencia y cultura*, págs. 43-49.
- Brauer, VS, Stomp, M., Rosso, C., van Beusekom, SA, Emmerich, B., Stal, LJ y Huisman, J. (2013). La baja temperatura retrasa el tiempo y aumenta el costo de la fijación de nitrógeno en la cianobacteria unicelular. *The ISME journal* , 7 (11), 2105–2115. doi: 10.1038 / ismej.2013.103
- Byrnes, B. (1990). Environmental effects of N fertilizer use—An overview. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 26(1), 209-215.
- Caffa, J. & De Bernardin, S. (2006). El ciclo del nitrógeno: la fijación del nitrógeno. Universidad nacional de Comahue.

Cárdenas, C., Perruolo, T., Tarre, Y., Flores, K., Trujillo, A., Saules, L., Araujo, I. & Yabroudi, S. (2006). Remoción de nutrientes en un reactor discontinuo secuencial. *Interciencia*, 31(11), pp. 787-793.

Castillo, K. E. (2013). Manual electrónico de control de calidad en medios de cultivo y cepas de referencia. México D.F.

Clark, T. A., Dare, P. H., & Bruce, M. E. (1997). Nitrogen fixation in an aerated stabilization basin treating bleached kraft mill wastewater. *Water Environment Research*, 69(5), 1039–1046.

Claros, J. A. (2012). Estudio del procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal. Departamento de ingeniería hidráulica y del medio ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

DANE (2014). Censo nacional agropecuario 2014. Inventario agropecuario en las unidades de producción agropecuaria.

DANE (2016). Encuesta nacional agropecuaria ENA del 2015. Boletín técnico.

De Roos, A. J., Ward, M. H., Lynch, C. F., & Cantor, K. P. (2003). Nitrate in public water supplies and the risk of colon and rectum cancers. *Epidemiology*, No 14.

Diaz, R. J. & Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926-929.

Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews. Microbiology*.

DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. (2007). Diazotrophic Medium - RBA. List of Media for Microorganisms.

Enviraj Consulting. (2018). Sequencing Batch Reactor (SBR).

Espín, G. (2007). Biología de Azotobacter vinelandii Instituto de Biotecnología, Cap. 6. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Estupiñan, R. & Quesada, B. (2010). El proceso Haber-Bosch en la sociedad agroindustrial: peligros y alternativas. Bogotá, Colombia.

FAO (1995) Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno. Leguminosa/Rhizobium.

Fernández, G. & Johnston, M. (2006). Capítulo XX. Crecimiento y temperatura. Libro Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena. La Serena, Chile.

Figueroa, J. M. (2007) Biological nitrogen fixation. Revista científica *UDO Agrícola*, 4.

Flower, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A. F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M. & Voss M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century.

Foster, P. & Ramaswamy, V. (2007). Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. London, United Kingdom and New York, USA, Cambridge University Press.

Galloway, J. N. Dentener, F. J. Capone, D. G. Boyer, E. W. Howarth, R. W. Seitzinger, S. P. Asner, G. P. Cleveland, C. C. Green, P. A. Holland, E. A. Michael, A. F. Porter, J. H. Townsend, A. R. & Smarty, V. R. (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70, págs. 153–226.

Galloway, J.N. Townsend, A.R. Erisman, J.W. Bekunda, M. Cai, Z. Freney, J.R. Martinelli, L.A. Seitzinger, S.P. Sutton, M.A. (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889–892.

García, H. D. (2010). Evaluación de transferencia de oxígeno en el sistema de tratamiento con lodos activados de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria en la Ciudad de México. Facultad de Ingeniería. Programa de

Maestría y Doctorado en Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Gauthier, F., Neufeld, J. D., Driscoll, B. T., & Archibald, F. S. (2000). Coliform bacteria and nitrogen fixation in pulp and paper mill effluent treatment systems. *Appl Environ Microbiol*, 66(12), 5155–5160.

Gibson, A. H. (1962). Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. The effect of root temperature on recently nodulated *trifolium subterraneum* L. plants.

Gulis, G., Czompolyova, M. & Cerhan, J. R. (2002). An ecologic study of nitrate in municipal drinking water and cancer incidence in Trnava District, Slovakia. *Environmental research*, A, No 88.

Gutiérrez, L.A. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Heffer P, Prud'homme M. (2010). Perspectiva de la industria de los fertilizantes a corto plazo 2010-2011. 36a Reunión ampliada del consejo de la asociación internacional de la industria de los fertilizantes (IFA). Nueva Delhi, India. 9 pp.

Hubbell, D. H. & Kidder, G. (2009). Biological nitrogen fixation. University of Florida IFAS Extension Publication SL16. 1-4.

Jawetz, P. Melnick, C. & Adelberg, S. (2010). Microbiología médica. 25<sup>a</sup> ed. México: McGraw Hill.

Kallio, P. & Kallio, S. (1978). Adaptation of nitrogen fixation to temperature in the *Peltigera Aphthosa* - group. Ecological Bulletins, No. 26, Environmental Role of Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae and Asymbiotic Bacteria, pp. 225-233.

Kelly, L. (2014). Psychrophile. Encyclopedia of astrobiology.

Kuypers, M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Microbial Biogeochemistry Reviews*. *Nature Reviews (Microbiology)*.

- Laboratorios Britania S.A. (2015). Nutritivo Agar. Caba - Argentina.
- Laboratorios Britania S.A. (2015). EMB Agar (con Eosina y Azul de Metileno). Caba - Argentina.
- Madigan, M. T. Martinko, J. M. Bender, K. S. Buckley, D. H. Stahl, D. A. & Brock, T. (2014). Brock biology of microorganisms (14th Edition).
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la República de Colombia (2017) Páramos. Ecosistemas de alta montaña y páramos.
- Muñoz, J. F. & Ramos, M. (2014). Reactores discontinuos secuenciales: Una tecnología versátil en el tratamiento de aguas residuales. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 24 (1), pp 49-66.
- National Research Council. (1994) Biological nitrogen fixation: Research Challenges. Washington, DC: National Academy Press.
- Nieder, R. & Bendi, D.K. (2008) Carbon and nitrogen in the terrestrial environment.
- Olivares, J. (2008) Fijación biológica de nitrógeno. Estación experimental del jardín. CSIC. Granada.
- Ospina, M. C. (2017) Use of nitrogen fixing microbial mixed cultures for wastewater treatment valorisation. PhD Annual Report. Colciencias.
- Peralta, J. S., & Serrato, M. G. (2016). Potencial de tratamiento anammox en la eliminación de amonio de medio sintético a escala de laboratorio a partir de inóculos de ambientes tropicales. Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- Pérez, N. (2006). Cuantificación de bacterias nitrificantes, desnitrificantes, fijadoras de nitrógeno y heterótrofas de humedales artificiales subsuperficiales el tratamiento de agua residual. Pregrado en biología. Santiago de Cali, Universidad del Valle.

Pérez, N., Peña, M. & Sanabria, J. (2011). Comunidades bacterianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en humedales construidos. Ingeniería y competitividad, 11(2), pp.83–92.

Rangel, O. (2008). Caracterización y regulación fisiológica de enzimas implicadas en la asimilación de nitrógeno orgánico en Prochlorococcus. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba.

Reid, P. & Hehre, W. (2007). Introducción a la fisicoquímica: termodinámica, traducido por A. Requena et al., México, Pearson Educación.

Rojas, A. (2011). Conceptos y práctica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.

Rodríguez, C. Sevillano, F. & Subramaniam, P. (1984) La fijación de nitrógeno atmosférico. Una biotecnología en la producción agraria. Instituto de los recursos naturales y agrobiología. Salamanca.

Rodríguez, C. L. (2014). Enriquecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre provenientes de sistemas de tratamiento de agua residual doméstica. Universidad del Valle. Cali, Colombia.

Rodríguez, O. M. (2014). Biofertilización de nitrógeno en suelos salinos a partir de consorcios microbianos obtenidos de sistemas de tratamiento de aguas residuales. Universidad del Valle. Cali, Colombia.

Roldán, G. & Ramírez, J. (2008). Fundamentos de limnología neotropical. Segunda edición. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Sapiña, F. (2006). ¿Un futuro sostenible?: El cambio global visto por un científico preocupado. Universidad de Valencia. 162p.

Slade, A., Anderson, S., Blackwell, B., Dare, P., & Pearson, H. (2001). Nitrogen fixation in the activated sludge treatment of thermomechanical pulping wastewater.

*TAPPI International Environmental, Health and Safety Conference and Exhibit*, 281–291.

Soto, L., & Baca, B. E. (2001). Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. Revista Latinoamericana de Microbiología, 43:37-49. Asociación Latinoamericana de Microbiología. Centro de Investigaciones Microbiológicas. Instituto de Ciencias. Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

Stal, L.J. (2009). Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature. *Environ Microbiol* **11**: 1632–1645.

Stal, L.J. (2017). The effect of oxygen concentration and temperature on nitrogenase activity in the heterocystous cyanobacterium *Fischerella* sp. Scientific Reports. Nature Research.

Stein, L. & Klotz, M. (2016). The nitrogen cycle.

Svedén, J. B., Adam, B., Walve, J., Nahar, N., Lavik, G., Whitehouse, M. J., Kuypers, M. M., & Ploug, H. (2015). High cell-specific rates of nitrogen and carbon fixation by the cyanobacterium *Aphanizomenon* sp. at low temperatures in the baltic sea.

Travers, D. (2007). Microbiología aplicada a las ciencias ambientales: reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales. Pregrado en Licenciatura Bioquímica. Montevideo, Universidad de la República.

Urquiaga, S. & Zapata F. (2000). Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en américa latina y el caribe. ARCALEMBRAPA. Porto Alegre. Río Grande. Brasil.

Vance, C. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology* **127**, 391-397.

Velázquez, D., Rochera, C., Camacho, A., & Quesada, A. (2011). Temperature effects on carbon and nitrogen metabolism in som maritime antarctic freshwater phototrophic communities.

Wagner, S. C. (2011). Biological nitrogen fixation. *Nature Education Knowledge* 3(10):15.

Ward, M. H., deKok, T. M., Levallois, P., Brender, J., Gulis, G., Nolan, B. T., & VanDerslice, J. (2005). Drinking water nitrate and health: recent findings and research needs. *Environmental health perspectives*, No 113.

Welz, P. L., et al. (2018). Bacterial nitrogen fixation in sand bioreactors treating winery wastewater with a high carbon to nitrogen ratio. *Journal of Environmental Management*. Volume 207. Pages 192-202.

Yáñez, F. (2000). Transferencia de oxígeno y aireación. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). Lima, Perú.

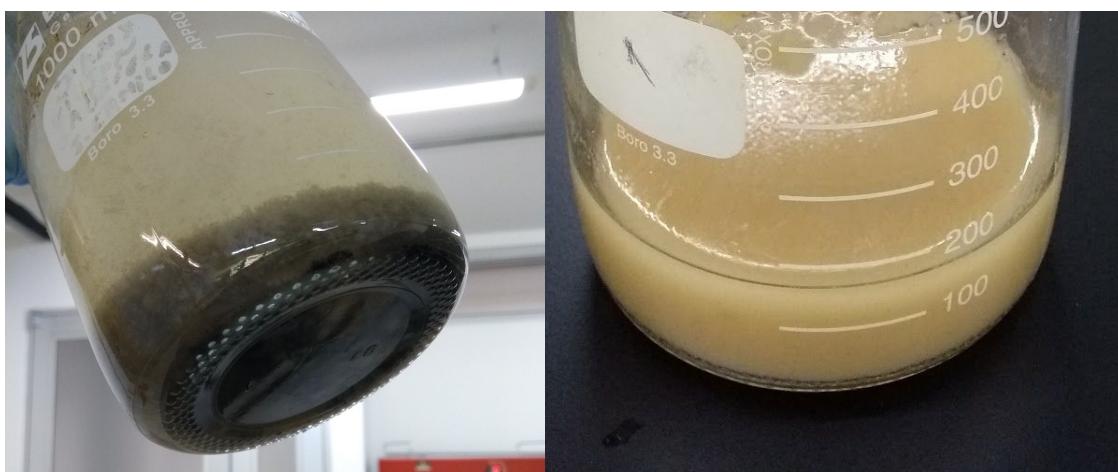
## 12. ANEXOS



**Anexo 1.** Toma de muestra lodo PTAR de Planta I de Carvajal Pulpa y Papel, Yumbo (Valle)



**Anexo 2.** Toma de muestra de suelo de cultivo de papa colorada y transporte, corregimiento Gabriel López - Totoró (Cauca)



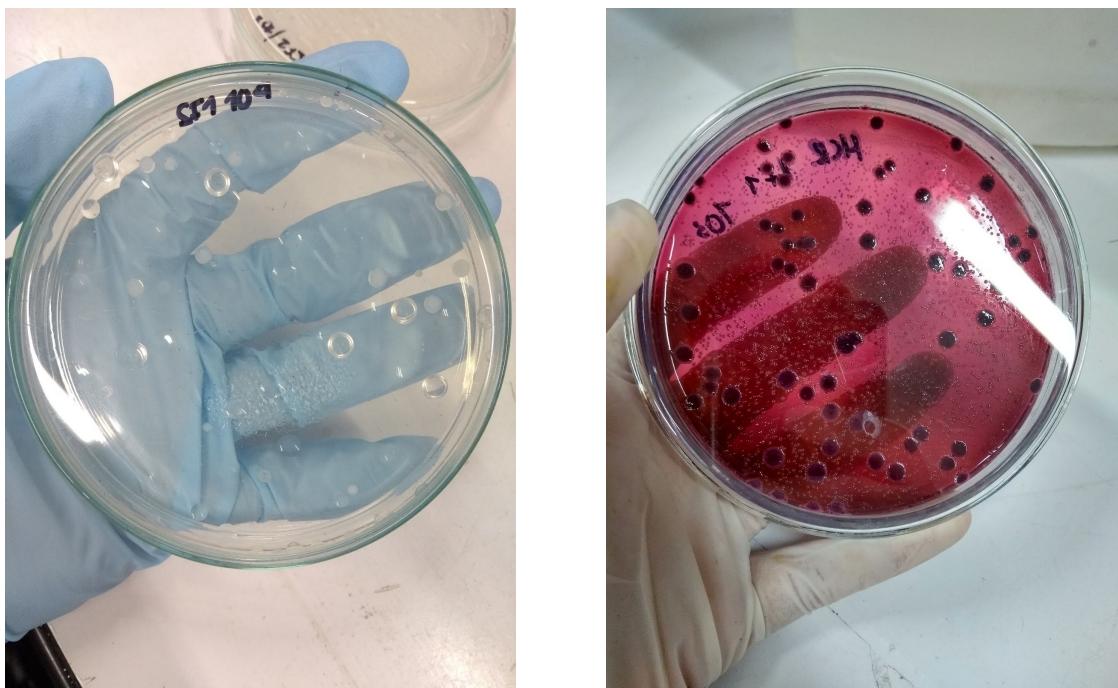
**Anexo 3.** Etapa de sedimentación en reactores



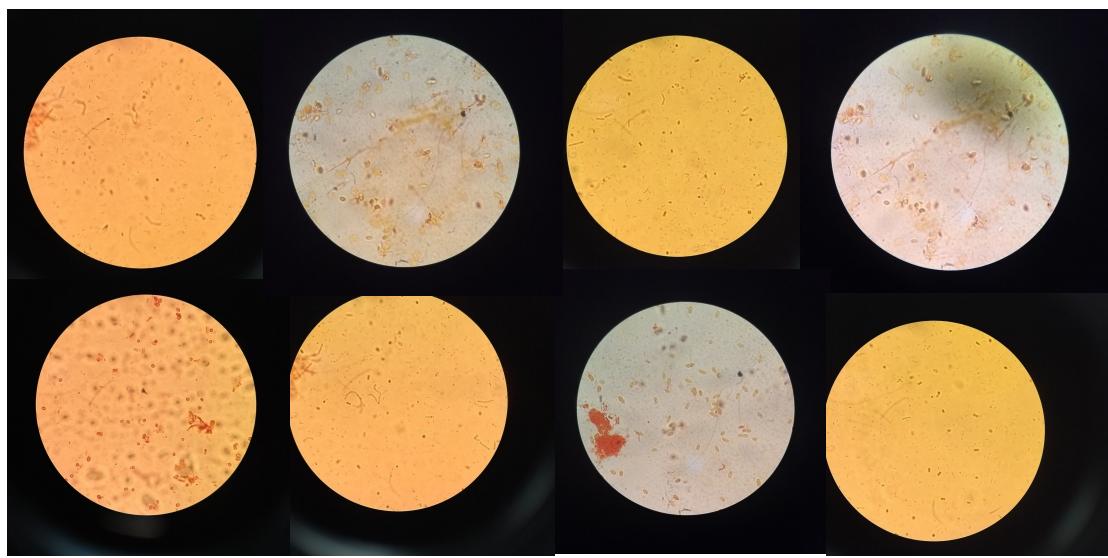
**Anexo 4.** Preparación de material para realización de siembra en placa



**Anexo 5.** Incubación de cajas de petri con Agar EMB, Agar Nutritivo y Agar RBA  
(24 y 48 horas)



**Anexo 6.** Ejemplo de morfologías de colonias encontradas en medio RBA (izq) y  
EMB (der)



**Anexo 7.** Ejemplo de morfologías vistas al microscopio en objetivo de 100X



**Anexo 8.** Inyección de CO<sub>2</sub> a reactores para eliminación de protozoos