



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

**UNIDAD ACADÉMICA DE INGENIERÍA,
INDUSTRIA Y CONSTRUCCIÓN**

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NITRIFICANTE DE
CEPAS BACTERIANAS CULTIVABLES AISLADAS DEL
SUELO DE UN BOSQUE NATIVO Y BOSQUE DE PINO
UBICADOS EN LA MICROCUENCA DEL
MACHÁNGARA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL**

AUTOR: STEEVEN ALEXANDER PEREIRA SAMANIEGO

**DIRECTOR: BLGA. MARJORIE JAZMÍN SALAZAR ORELLANA
MSc.**

CUENCA _ ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

**UNIDAD ACADÉMICA DE INGENIERÍA, INDUSTRIA Y
CONSTRUCCIÓN**

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NITRIFICANTE DE CEPAS
BACTERIANAS CULTIVABLES AISLADAS DEL SUELO DE UN
BOSQUE NATIVO Y BOSQUE DE PINO UBICADOS EN LA
MICROCUENCA DEL MACHÁNGARA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL**

AUTOR: STEEVEN ALEXANDER PEREIRA SAMANIEGO

**DIRECTOR: BLGA. MARJORIE JAZMÍN SALAZAR ORELLANA
MSc.**

CUENCA - ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

Steeven Alexander Pereira Samaniego portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0706373057**. Declaro ser el autor de la obra: **“Evaluación del potencial nitrificante de cepas bacterianas cultivables aisladas del suelo de un bosque nativo y bosque de pino ubicados en la microcuenca del Machángara”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **17 de enero de 2022**



F:

Steeven Alexander Pereira Samaniego

C.I. 0706373057

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Steeven Alexander Pereira Samaniego, bajo mi supervisión.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Salazar', is positioned above a horizontal line.

Blga. Marjorie Jazmín Salazar Orellana MSc.

DIRECTOR

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación es en memoria de mi querido abuelo Tito Eduardo Samaniego Ordoñez, él siempre fue una luz en mi vida y hoy con su bendición culmino una etapa maravillosa, tal vez con su ausencia, pero con muchos recuerdos valiosos en mi corazón y mente. De igual manera dedico este trabajo a mi papá, mamá y hermanos, ellos me han inculcado valores de respeto, responsabilidad y honestidad. Así mismo han sido una inspiración de superación, de fortaleza y quienes me han enseñado a cada día mejorar como ser humano y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por cada persona de buen corazón y alma noble que ha puesto en mi vida, de manera muy especial quiero agradecer a mi tutora Blga Jazmín Salazar, quien con sus conocimientos y apoyo incondicional me ha sabido guiar en este arduo trabajo investigativo. Quedo muy agradecido con el Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología CIITT de la Universidad Católica de Cuenca, y a su vez con su equipo de profesionales, de manera especial: Ing. Lourdes Reinoso, Ing. María Eugenia Quinteros, Ing. Carlos Matovelle, Dr. Juan Carlos González e Ing. María José Carrera por haber sido un faro en todo este proceso.

También quiero agradecer a mis amigos y próximos colegas, por sus palabras de aliento en situaciones adversas y por todas las experiencias dentro del entorno académico y personal. De igual manera, agradezco a mi Novia y a su familia por no haber soltado mi mano en momentos difíciles de mi vida, así como en todo este proceso, en el cual han sido un pilar muy fuerte en el que me he sostenido.

Por último, pero no menos importante agradezco por todos estos años de enseñanza a los docentes de Ingeniería Ambiental de manera particular a mi cotutora Blga. Paula Cordero.

RESUMEN

La nitrificación forma parte del ciclo del nitrógeno que ocurre naturalmente en los ecosistemas y está relacionado con la presencia de microorganismos y su metabolismo, especialmente bacterias, que intervienen en el proceso de oxidación de compuestos como el NH_4^+ y NO_2^- a NO_3^- . En este estudio se aislaron bacterias que forman parte de la microbiota del suelo de un bosque nativo y bosque de pino ubicados en el sector El Labrado, dentro de la microcuenca del Machángara. Se evaluó su potencial nitrificante, con el fin de identificar cepas heterotróficas y litoautotróficas oxidantes de NH_4^+ y NO_2^- empleando los medios de cultivo OAL, ONL, ONH y OAH. Los resultados de los halos nitrificantes formados en los medios de cultivo, permitieron identificar 10 cepas con potencial nitrificante, 5 del bosque de pino, 4 del bosque nativo y una compartida. Los géneros *Serratia* y *Bacillus* presentan una alta capacidad de oxidación de NO_2^- . Posteriormente, fueron aplicadas en un agua sintética rica en productos nitrogenados obteniendo como resultados porcentajes entre el 40% y 94% de reducción de nitritos y tiempos de retención celular de 20 a 40 días. Hallazgos alentadores para su posible uso potencial en procesos de biorremediación ambiental.

Palabras clave: nitrificación, suelo, remediación ambiental, microbiota

ABSTRACT

Nitrification is part of the nitrogen cycle that occurs naturally in ecosystems and is related to the presence of microorganisms and their metabolism, especially bacteria, which are involved in the process of oxidation of compounds such as NH_4^+ y NO_2^- to NO_3^- . In this study, bacteria that are part of the soil microbiota of a native forest and pine forest located in the "El Labrado" sector, within the Machángara micro-watershed, were isolated. Their nitrifying potential was evaluated to identify heterotrophic and lithoautotroph strains that oxidize NH_4^+ and NO_2^- using OAL, ONL, ONH and OAH culture media. The results of the nitrifying halos formed in the culture media allowed the identification of 10 strains with nitrifying potential, 5 from the pine forest, 4 from the native forest, and one shared, The *Serratia* and *Bacillus* genera have a high NO_2^- oxidation capacity. Subsequently, they were applied in synthetic water rich in nitrogen products, obtaining as results percentages between 40% and 94% of nitrate reduction and cell retention times of 20 to 40 days. Encouraging finding for their possible potential use in environmental bioremediation processes.

Keywords: nitrification, soil, environmental remediation, microbiota

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD.....	- 2 -
CERTIFICACIÓN	- 3 -
DEDICATORIA	- 4 -
AGRADECIMIENTOS.....	- 5 -
RESUMEN	- 6 -
ABSTRACT.....	- 7 -
ÍNDICE DE CONTENIDOS	- 8 -
LISTA DE FIGURAS.....	- 10 -
LISTA DE TABLAS	- 11 -
LISTA DE ANEXOS.....	- 12 -
CAPÍTULO I.....	- 13 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 13 -
1.1 OBJETIVO GENERAL	- 14 -
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 14 -
CAPÍTULO II.....	- 15 -
2. REVISIÓN DE LITERATURA	- 15 -
2.1. EL NITRÓGENO	- 15 -
2.1.1. <i>Nitritos</i>	- 15 -
2.1.2. <i>Nitratos</i>	- 16 -
2.2. CICLO DEL NITRÓGENO	- 16 -
2.2.1. <i>Nitrificación</i>	- 17 -
2.2.2. <i>Desnitrificación</i>	- 18 -
2.3. POTENCIAL NITRIFICANTE DE LAS BACTERIAS	- 18 -
2.4. ROL DE LAS BACTERIAS EN EL SUELO	- 19 -
2.5. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS EN EL CICLO DEL NITRÓGENO	- 20 -
2.5.1. <i>Importancia de las bacterias nitrificantes en el suelo</i>	- 20 -
2.5.2. <i>Importancia de las bacterias nitrificantes en el agua</i>	- 21 -
2.6. USO POTENCIAL DE BACTERIAS NITRIFICANTES.....	- 21 -
2.6.1. <i>Uso de bacterias nitrificantes en procesos de biorremediación.</i>	- 22 -
2.7. BOSQUE NATIVO	- 22 -
2.8. BOSQUE DE PINO	- 23 -
CAPÍTULO III.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. ÁREA DE ESTUDIO	24
3.1.1 <i>Parámetros físico-químicos del área de estudio</i>	26
3.2 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES	26
3.2.1 <i>Colecta de muestra</i>	26
3.2.2 DENSIDAD BACTERIANA POR EL NMP	26
3.3. REACTIVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CULTIVABLES:.....	28
3.4. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NITRIFICANTE	28
3.5. DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN (NO ³⁻)	29

3.6. APLICACIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES EN MEDIO SINTÉTICO RICO EN PRODUCTOS NITROGENADOS	30
3.6.1 <i>Tratamiento de datos</i>	31
CAPÍTULO IV.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD BACTERIANA	32
4.2. DETERMINACIÓN DE POTENCIAL NITRIFICANTE	33
4.3. ESTIMACIÓN DE PRODUCTOS DE OXIDACIÓN	- 35 -
4.4. APLICACIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES EN MEDIO SINTÉTICO RICO EN PRODUCTOS NITROGENADOS.	- 36 -
4.4.1 <i>Disminución de los niveles de NO²⁻</i>	- 36 -
4.4.2 <i>Modelación del comportamiento</i>	- 38 -
CAPÍTULO V.....	- 41 -
5. CONCLUSIONES.....	- 41 -
CAPÍTULO VI.....	- 42 -
6. RECOMENDACIONES	- 42 -
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 43 -
ANEXOS	- 48 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de la Microcuenca del Machángara.....	24
Figura 2. Ubicación de parcelas dentro del sector El Labrado.	25
Figura 3: Shaker con muestras y mecanismo de incubación con sensor de temperatura.....	29
Figura 4: Preparación de blanco y muestra.....	30
Figura 5: Registro de lectura	30
Figura 6: Placa de microdilución bosque nativo.	32
Figura 7: Placa de microdilución bosque de pino.	32
Figura 8: Halo de acidificación <i>Y. enterocolítica</i>	34
Figura 10: Halo de acidificación <i>S. plymuthica</i>	34
Figura 11: Curvas de oxidación de NO ²⁻ <i>Mycobacterium Sp.</i> y <i>S. plymutica</i>	- 37 -
Figura 12: Curvas de oxidación de NO ²⁻ <i>B. pumillus</i> y <i>B. ferraguliae</i>	- 37 -
Figura 13: Curvas de oxidación de NO ²⁻	- 38 -

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Coordenadas geográficas de parcelas de muestreo.	25
Tabla 2: Parámetros físico químicos del área de estudio.....	26
Tabla 3: Composición de los medios de cultivo para determinar bacterias oxidantes de amonio y nitritos.....	27
Tabla 4: Compuestos para el indicador rojo de metilo	28
Tabla 5: Resultados de densidad bacteriana	32
Tabla 6: Cepas bacterianas aisladas del suelo del bosque nativo y bosque de pino.	33
Tabla 7: Cepas con potencial nitrificante y medición del halo de acidificación.....	34
Tabla 8: Estimación de presencia de productos de oxidación.....	- 36 -
Tabla 9: Resultados de regresión lineal de las cepas evaluadas.....	- 39 -

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Colecta de muestras de suelo.....	- 48 -
Anexo 2: Densidad bacteriana	- 48 -
Anexo 3: Reactivación de cepas	- 49 -
Anexo 4: Evaluación de potencial nitrificante	- 50 -
Anexo 5: Tablas de lecturas de nitritos	- 51 -

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema complejo y dinámico provee de hábitats capaces de soportar a la gran mayoría de organismos vivos. En Ecuador existe gran diversidad florística debido a las condiciones climáticas y los pisos altitudinales del país, dentro de la microcuenca del Machángara la combinación de climas y altitudes proporciona una variedad de tipos de ecosistemas. Sin embargo, dichos ecosistemas y los servicios que nos brindan se ven amenazados por el cambio en el uso de suelo y se refleja en el crecimiento de los mosaicos agropecuarios.

Los microorganismos son la parte viva del suelo, están encargados de degradar la parte orgánica de la materia, para una posterior asimilación de nutrientes por otros seres vivos, estos pueden transformar una enorme cantidad de materia orgánica, esto gracias a sus procesos metabólicos tan particulares (Tumiri, 2017). Las bacterias ejercen un rol importante dentro del ciclo biogeoquímico del nitrógeno N, ya que mediante estas se pueden oxidar los nitritos a nitratos, resultando en un proceso de nitrificación, lo cual transforma la gran parte de nitrógeno no aprovechable en su par aprovechable, dicha transformación resulta benéfica para el desarrollo de las plantas (Lamprea et al., 2015).

El N en las cantidades adecuadas es un nutriente indispensable en el desarrollo de la flora, este elemento se encuentra desde el 1% al 2% en el suelo, el mismo con el pasar del tiempo y el desarrollo tecnológico, se ha venido convirtiendo en una problemática para los suelos y cuerpos de agua, debido a su presencia excesiva por los fertilizantes químicos o la elevada cantidad de excretas de ganado (Andreu et al., 2006).

El componente biológico del suelo ha sido el menos estudiado, pese a su importancia en el aporte de nutrientes. Esta investigación nace debido a la carencia de información sobre los microorganismos y el papel de las bacterias nitrificantes en procesos de biorremediación y producción agrícola. Este estudio tiene como objetivo determinar el potencial nitrificante de las bacterias cultivables aisladas del suelo de un bosque nativo y un bosque de pino en la Microcuenca del Machángara mediante técnicas bioquímicas.

El estudio parte del aislamiento e identificación de la comunidad bacteriana cultivable. Dentro de la metodología a aplicar se encuentra la reactivación de las cepas bacterianas, la estimación de la densidad bacteriana, la evaluación del potencial nitrificante y la aplicación de las bacterias en un medio sintético (Botello et al., 2015). Dentro de las partes finales del estudio se pretende conceptualizar el posible uso de las bacterias con potencial nitrificante en procesos de biorremediación de agua residuales, lixiviados y su aporte dentro

de la producción agrícola, ya que permiten la absorción y disponibilidad de el nitrógeno, así como de otros elementos aprovechables para el desarrollo de las plantas.

1.1 Objetivo general

Evaluar el potencial nitrificante de las bacterias cultivables aisladas de suelo de un bosque nativo y bosque de pino en la Microcuenca del Machángara mediante técnicas bioquímicas.

1.2 Objetivos específicos

- Estimar la densidad de bacterias nitrificantes del suelo de un bosque nativo y bosque de pino.
- Determinar el potencial nitrificante de las bacterias cultivables aisladas del suelo de un bosque nativo y bosque de pino.
- Evidenciar la presencia de productos de oxidación en el proceso de nitrificación.
- Cuantificar la eficiencia de las bacterias nitrificantes aisladas del suelo de un bosque nativo y bosque de pino mediante su aplicación en un medio sintético, rico en compuestos nitrogenados.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento diatómico que se encuentra en estado gaseoso a temperatura y presión constante, comprende el 78% de la atmósfera terrestre y en su forma elemental es relativamente inerte. La química del N se torna compleja debido a los diversos estados de oxidación que puede asumir y al hecho de que ese cambio en el estado puede ser llevado a cabo por organismos vivos, como las bacterias, pudiendo ser positivo o negativo, en función de las condiciones aeróbicas o anaeróbicas en las que se haya desarrollado. Desde el punto de vista de la química inorgánica, el N puede existir en siete estados de oxidación (Pacheco et al., 2002).

El N se traslada paulatinamente mediante un ciclo biogeoquímico que permite su absorción por los elementos abióticos y los seres vivos, es uno de los ciclos más relevantes para mantener el equilibrio de la biósfera terrestre, siendo el elemento químico más abundante en la atmósfera y un elemento básico para los seres vivos porque permite elaborar aminoácidos, ácido desoxirribonucleico-ADN y proteínas.

Por otra parte, un porcentaje numeroso de seres vivos no pueden aprovechar el N sin haber ejecutado previamente el ciclo biogeoquímico del mismo, con la excepción de microorganismos especializados, como algas o bacterias. La dinámica del N en la biosfera comprende procesos como: la fijación de N, nitrificación, desnitrificación, mineralización y la oxidación de amonio Annamox de manera anaerobia, mediados principalmente por microorganismos inmersos en el suelo. El N es inmerso en la biósfera mediante la fijación química y biológica del nitrógeno molecular N_2 , y es removido de la de la biósfera mediante la desnitrificación (Cerón y Aristizábal, 2012).

2.1.1. Nitritos

Los nitritos aparecen en la naturaleza por procesos microbiológicos, como lo es la oxidación del amoníaco y la reducción del nitrato en condiciones anaeróbicas. El ion nitrito NO_2^- es resultante de la unión angular con una configuración electrónica, similar a la ocuriente con el ozono, los nitritos pueden estar inmersos en la formación de sales o esteres, partiendo del ácido nitroso (Lamprea et al., 2015).

La incidencia de los nitritos en elevadas cantidades en el agua puede resultar tóxicas para los peces, si dicho elemento se encuentra por encima de 0.4 mg/l pueden exterminar

hasta el 50% de la población de peces (Cerón y Aristizábal, 2012). Los nitritos al constar en cantidades elevadas dentro de las actividades agrícolas, pueden afectar directamente a los seres humanos debido a la contaminación por nitritos existente en productos vegetales o cárnicos, y traducirse en consecuencias directas en el organismo de los seres humanos desencadenando problemas en el organismo, llegando a convertirse en cáncer (Almudena y Lizaso, 2001).

2.1.2. Nitratos

El nitrato NO_3^- forma parte de las estructuras oxidadas del nitrógeno, siendo está una de las formas más estables, a pesar de tener una reactividad química baja, este elemento puede ser reducido mediante el metabolismo microbiano en condiciones aeróbicas, los nitratos se encuentran inmersos en la naturaleza como resultados de la descomposición de compuestos nitrogenados (Acosta, 1999).

Los nitratos son parte importante en el crecimiento de los cultivos, aportando oxígeno y nitrógeno a los mismos. El suelo al ser pobre en nitratos genera un desequilibrio, afectando a los cultivos por la falta de nutrientes, generando un crecimiento anormal de las plantas, lo cual tendría como resultante plantas delgadas y pequeñas (Andreu et al., 2006). Sin embargo, al tener un exceso de nitratos en el agua o suelo, se podría convertir en una amenaza para los seres vivos, generando enfermedades como: la hipoxia en seres humanos y gastroenteritis en animales (Almudena y Lizaso, 2001).

2.2. Ciclo del nitrógeno

El ciclo biogeoquímico del N es el mecanismo principal por el cual la reserva de nitrógeno de la atmósfera se vuelve disponible para los seres vivos. La transformación de nitrógeno inerte en nitrógeno reactivo implica muchos procesos como: nitrificación, amonificación, etc. que cambian el estado de oxidación del nitrógeno. Debido a la existencia de nitrógeno en los estados de valencia que van desde $-3(\text{NH}_3)$ a $+5(\text{NO}_3^-)$ son posibles numerosas transformaciones de nitrógeno. Mediante el metabolismo microbiano la energía que es liberada por las transformaciones del nitrógeno es aprovechada, las actividades microbianas juegan un rol significativo en la circulación de nitrógeno en la geobiosfera (Corrales et al., 2015).

Los procesos naturales que intervienen en el ciclo del nitrógeno son: la nitrificación, la cual es la transformación bacteriana de NH_3 en NO_2^- y luego en NO_3^- ; la desnitrificación

que es la transformación bacteriana de NO^{3-} no utilizados en N atmosférico; la amonificación que es la transformación de los desechos orgánicos en amoníaco; posteriormente, la asimilación que es la absorción de NO^{3-} y NH_4^+ por las raíces de las plantas y por último la fijación que es la transformación bacteriana del N atmosférico en compuestos nitrogenados. La fijación de nitrógeno es principalmente la conversión de nitrógeno “inerte” en nitrógeno “reactivo” a través de procesos naturales de rayos o por microbios simbióticos y de vida libre (Singh y Bakshi, 2013).

2.2.1. Nitrificación

La nitrificación es una etapa relevante que se encuentra inmersa en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, la cual consiste en la oxidación del amonio, mediante el metabolismo microbiano, hasta el momento se ha identificado tres géneros de bacterias nitrificantes las *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* y *Nitrobacter*. En el proceso de nitrificación se produce energía, la misma que será destinada para la síntesis de ATP, los macroorganismos inmersos en la nitrificación son quimioautótrofos, estos emplean el CO_2 como su principal fuente de carbono para crecer (Bear y Snyder, 2015).

Las bacterias inmersas en el proceso, se encuentran divididas en dos grupos, las bacterias amonioxidantes (AOB) y las bacterias nitritoxidantes (NOB). Las AOB son las encargadas de la conversión del N amoniacal a NO^{2-} , teniendo la formación de hidroxilamina como un producto intermedio, y las NOB transformarán los nitritos en nitratos (Claros, 2012).

Según Claros (2012) “En las presente ecuaciones se encuentra expuesta la estequiometría de las reacciones bioquímicas de oxidación de amonio y oxidación de nitrito, respectivamente”.

Etapa 1: Organismos AOB



Etapa 2: Organismos NOB



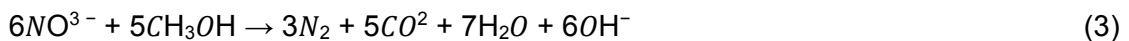
En las dos etapas expuestas en las ecuaciones anteriores existe una producción de energía que es aprovechada por los microorganismos para su posterior mantenimiento y desarrollo.

2.2.2. Desnitrificación

La desnitrificación es la reducción de nitratos a nitritos, y consecuentemente a compuestos de N en estado gaseoso (NO , N_2O Y N_2), esto en presencia de una fuente de carbono orgánica. Para que el proceso de desnitrificación se lleve a cabo se necesita que el ambiente de desarrollo sea anóxico o carente de oxígeno, ya que dentro del proceso de nitrificación los nitritos y nitratos son empleados para la respiración microbiana, así como aceptores de electrones. Dentro del proceso de desnitrificación existen una variedad de microorganismos inmersos, esto se da debido a que, la mayoría de microorganismos desnitrificantes son facultativos, y tienen la posibilidad de emplear O NO^{3-} y NO^{2-} como captor de electrones (Ferrara y Ramírez, 2013).

“La reacción general de desnitrificación utilizando metanol como fuente de carbono orgánico se representa en la ecuación. De acuerdo a esta reacción, 1.9 g de CH_3OH (2.86 g cuando es expresado como Demanda Química de Oxígeno - DQO) se consumen para reducir 1 g de N-NO^{3-} ” (Claros, 2012).

Desnitrificación con metanol:



En la desnitrificación existe un incremento del pH debido a que la alcalinidad aumenta y disminuye el ácido ascórbico (Claros, 2012).

2.3. Potencial nitrificante de las bacterias

El proceso de nitrificación es la oxidación biológica del NH_4^+ a NO^{3-} mediante los microorganismos aerobios, a través de sus procesos metabólicos, los cuales usan el oxígeno molecular O_2 como aceptor de electrones, es decir, funciona como un oxidante. La nitrificación es un proceso benéfico para los microorganismos, ya que mediante este pueden obtener energía, así como por la oxidación de nitritos y a través de la respiración celular. Las poblaciones de microorganismos autótrofos, que realizan este proceso de nitrificación, utilizan dos formas de nitrógeno reducido, amoníaco y nitritos, como fuente de energía para sus procesos metabólicos, transformándolo al final en nitratos o nitrógeno orgánico, el mismo que puede ser utilizado por otros organismos (Elbanna et al., 2012).

“Las bacterias nitrificantes son un ensamblaje de procariotas quimiolitotóxicas, que se encuentran flotando en la columna de agua, conformando parte del bacterioplancton” (Mendoza et al., 2019, p. 2). La nitrificación es resultante de la acción consecutiva de dos grupos de bacterias, las bacterias oxidantes de amonio BOA y bacterias oxidantes

de nitritos BON, desarrollando el proceso, en forma sinérgica. Las BOA oxidan el NH_4^+ a NO_2^- y las BON continúan con el proceso de nitrificación al utilizar el NO_2^- producto del proceso anterior para oxidarlo a NO_3^- . De este modo, las bacterias nitrificantes regulan los posibles efectos y el riesgo de eutrofización, que puede tener la entrada del N alóctono en los lagos meso-oligotróficos, esto mediante el metabolismo bacteriano, mismo que consume las formas inorgánicas y contribuyen al equilibrio del ciclo biogeoquímico (Mendoza et al., 2019).

La eliminación convencional del amonio consta de dos pasos: nitrificación por autótrofos en condiciones aeróbicas y desnitrificación por heterótrofos en condiciones anaeróbicas. Este tipo de sistema es difícil de operar debido a la baja tasa de nitrificación y la complejidad de separar los reactores de nitrificación y desnitrificación (Chen y Ni, 2011).

2.4. Rol de las bacterias en el suelo

Las bacterias nitrificantes están muy extendidas en el suelo y son responsables del mantenimiento de la fertilidad del suelo (Elbanna et al., 2012). Estas son capaces de transformar compuestos nitrogenados en otros, los mismos que serán asimilables para las plantas y aportarán a su crecimiento, las bacterias nitrificantes son organismos quimiolitotróficos y autótrofos, los cuales obtienen su propia energía mediante la oxidación de compuestos orgánicos y se encuentran inmersas dentro del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Myrold y Posavatz, 2007).

Los microorganismos del suelo se pueden utilizar con una amplia gama de compuestos de N, pero se estima que prefieren el NH_4^+ , sin embargo, dentro de los estudios de dilución de N se ha demostrado que la utilización microbiana de NO_3^- potencia la inmovilización, de modo que la contribución es relativa respecto a las bacterias y hongos, las mismas que presentan un potencial genético para poder emplear fuentes orgánicas e inorgánicas de N. Dentro de los estudios aplicados se ha demostrado que las bacterias nitrificantes, pueden adaptarse a los dos tipos de nitrógeno orgánico e inorgánico (Myrold y Posavatz, 2007). Las comunidades de microorganismos del suelo pueden remover N de los ecosistemas terrestres mediante la nitrificación, por tanto, reducir el potencial de contaminación (Sepúlveda et al., 2012).

2.5. Importancia de las bacterias en el ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es aprovechado por los seres vivos mediante los procesos metabólicos de las bacterias y otros procariontes unicelulares que convierten el N atmosférico N_2 , en formas biológicamente aprovechables mediante un proceso denominado fijación de nitrógeno, algunas especies de bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentran libremente en el suelo o el agua, mientras que otras son simbiotes benéficos que habitan dentro de las plantas. Dentro de las bacterias nitrificantes se encuentran las cianobacterias fotosintéticas, estas están inmersas en gran variedad de ecosistemas acuáticos, los cuales tiene presencia de luz solar y cumplen un rol fundamental en cuanto a la fijación del nitrógeno; otro tipo de bacteria, *Rhizobium*, vive como simbiote en las raíces de las plantas leguminosas como los chícharos, los frijoles y los cacahuates, este les provee de nitrógeno fijo. Las bacterias del género *Azotobacter* son fijadoras de nitrógeno clave en los ecosistemas terrestres (Myrold y Posavatz, 2007).

Para el proceso de transformación de nitrógeno atmosférico en amoníaco NH_3 , se necesita que los macroorganismos fijadores de nitrógenos capturen el N atmosférico y posteriormente realicen la conversión, con el fin de que el NH_3 pueda ser absorbido y empleado por las plantas en la producción de moléculas orgánicas. En metabolismo animal están inmersas moléculas nitrogenadas, para lo cual, el metabolismo de los animales ayuda a la degradación y desecho de dichas moléculas a manera de excretas, así como la urea en la orina (Bear y Snyder, 2015).

Las bacterias convierten los compuestos nitrogenados de los organismos muertos o sus desechos, en NH_3 , el cual es convertido después en NO^{2-} y NO^{3-} . En la fase de nitrificación las bacterias cumplen un rol fundamental, la nitrificación es realizada en dos pasos por diferentes bacterias: primero, las bacterias del suelo *Nitrosomonas* y *Nitrococcus* realizan la conversión del amonio en NO^{2-} , consecuente de ello, las bacterias de género *Nitrobacter*, oxidan los NO^{2-} en NO^{3-} . La nitrificación aporta energía a las bacterias. No se conoce ningún quimiolitautótrofo que lleve a cabo la oxidación completa de NH_4^+ a NO^{3-} ; por ello, la nitrificación en la naturaleza resulta de la acción secuencial de dos grupos separados de organismos, las bacterias oxidantes de amonio y las bacterias oxidantes de nitritos (Lamprea et al., 2015).

2.5.1. Importancia de las bacterias nitrificantes en el suelo

La importancia de las bacterias nitrificantes en el suelo radica en la ejecución del ciclo del nitrógeno, ya que al completarse se libera la parte aprovechable del nitrógeno orgánico

existente, lo cual es beneficioso para la nutrición de las plantas, así como para el desarrollo del microbiota del suelo.

Las bacterias nitrificantes por medio del proceso de oxidación de NO^{2-} , contrarresta el NH_4^+ existente en el sistema, lo cual aumenta la probabilidad del crecimiento de la vegetación en dicho suelo, sea para cultivos productivos o en procesos de restauración (Rodríguez et al., 2017).

2.5.2. Importancia de las bacterias nitrificantes en el agua

Los tratamientos biológicos son muy atractivos para poder tratar los efluentes de aguas residuales, los cuales que permiten disminuir la carga de contaminantes presentes en las mismas. Si bien es cierto una de las problemáticas de los tratamientos de aguas residuales son los lodos activados, los cuales muchas de las veces son muy complejos de estabilizar, para ello se han implementado tratamientos biológicos en los cuales se encuentran inmersas bacterias nitrificantes, para dichos tratamientos se destinan condiciones aerobias y anóxicas, en las cuales existe un intercambio de aceptores de electrones, lo cual permitirá poder llevar a niveles estables los NO^{2-} y NO^{3-} (Ferrara y Ramírez, 2013).

Al igual que en el suelo, en el medio líquido de la tierra, las bacterias nitrificantes, aportan al ciclo del nitrógeno, lo cual permite que el nitrógeno sea aprovechado por las especies marinas para su posterior desarrollo y mantenimiento.

2.6. Uso potencial de bacterias nitrificantes

El evaluar el potencial nitrificante de las bacterias es de particular importancia para el tratamiento eficiente de las aguas residuales domésticas donde se desea la eliminación simultánea de nitrógeno orgánico e inorgánico. Las bacterias que resulten altamente nitrificantes tienen un impacto positivo en cuanto a los procesos de biorremediación, ya sea para controlar excesos de nitrógeno orgánico e inorgánico en cuerpos de agua (Avendaño, 2011).

Las bacterias nitrificantes regulan los efectos y los riesgos de eutrofización, el cual es un fenómeno de carácter antropogénico debido principalmente al vertimiento de elevadas concentraciones de nitrógeno, el N alóctono llega a los lagos meso-oligotróficos, y mediante el metabolismo de las bacterias nitrificantes, contribuyen al ciclo biogeoquímico del nitrógeno al consumir sus formas inorgánicas (Botello et al., 2015).

El uso potencial de bacterias nitrificantes en el suelo, se relaciona con fines agrícolas y de conservación debido a la nueva inserción de nitrógeno que las bacterias nitrificantes pueden aportar al suelo, lo cual contribuye en el desarrollo de flora y de la microbiota (Tumiri, 2017).

2.6.1. Uso de bacterias nitrificantes en procesos de biorremediación.

En los procesos de biorremediación se encuentran inmersos organismos y microorganismos, los cuales servirán como un potencial descontaminante del medio a tratar, sea sólido y líquido (suelo y agua). Dentro de los procesos de biorremediación de suelo, la biotecnología está a la vanguardia, en cuanto a los nuevos mecanismos a emplear y como coadyuvar a los procesos establecidos con anterioridad. Los medios físicos de la tierra se encuentran en constante riesgo de contaminación por actividades antrópicas, sean: la presencia de la agricultura extensiva, el sobrepastoreo, la minería o los constantes derrames de contaminantes.

En el estudio del lago Tota en Colombia de Mendoza (2019) se puede observar una de las aplicaciones de las bacterias nitrificantes, ya que este se centra en el desequilibrio de los nitritos y nitratos inmersos en dicho lago, para lo cual el autor recalca la importancia de la presencia de las bacterias nitrificantes, ya que estas han contribuido al equilibrio de amonio presente, lo cual indica que las bacterias con potencial nitrificante son un posible regulador de los procesos de eutrofización.

Las bacterias nitrificantes o fijadoras de nitrógeno se pueden emplear en procesos de biorremediación de suelos, inoculándose a la par con una técnica de plantación de especies fijadoras de nitrógeno empleadas regularmente en procesos de restauración ecológica, resultarían en un proceso con mayores probabilidades de éxito en cuanto a la recuperación de suelo (García, 2011).

2.7. Bosque nativo

El bosque nativo se encuentra ubicado en la zona media de la microcuenca del Machángara, los parches de bosques nativos forman un dosel cerrado de entre 2 a 4 metros de altura, estos se ubican entre los 3000 y 4000 m s.n.m. Se los puede divisar en sitios talados, quemados o con pendientes muy pronunciadas. Este tipo de ecosistema es muy frágil, ya que es bastante vulnerable a la erosión debido a las pendientes y por lo regular se encuentran ubicados en zonas con intensas lluvias, con una precipitación

promedio anual de 2500 mm para las zonas bajas y 5000 mm para las zonas más altas, también se encuentran expuestos a cambios climáticos teniendo una temperatura fluctuante entre los 9 y 17 grados Celsius (Bussmann, 2005).

2.8. Bosque de pino

El *Pinus patula* o su nombre común pino, es una especie introducida en el Ecuador aproximadamente en el año 1905 proveniente desde Norte América, esta es una especie maderera de ciclo corto. En la microcuenca del Machángara existen varias plantaciones de pino a lo largo de la misma, estas plantaciones se han concentrado a manera de bosques debido a que carecen de cuidado forestal. Las plantaciones de pino presentes en la microcuenca del río Machángara se encuentran dispersas sobre los 3000 metros de altura, teniendo un área aproximada de 500 ha, con pendientes muy pronunciadas y altos niveles de precipitación debido a su ubicación geográfica en las alturas de bosques andinos. Estos factores hacen del suelo sensible a la erosión (Padrón y Vázquez, 2019).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de Estudio

El área de estudio se encuentra ubicada en la microcuenca del río Machángara dentro del Bosque Protector Machángara Tomebamba, en el austro ecuatoriano, correspondiente al sistema hidrográfico del río Santiago, el cual ocupa un territorio de 32.544 ha., localizadas en las parroquias de Checa, Chiquintad, Sinincay, Sayausí, Octavio Cordero Palacios, Ricaurte, Sidcay, Jerusalén, Nazón, Turupamba, Cojitambo, Deleg, Javier Loyola y Solano (figura 1) (Calle, 2020). Cuenta con un rango altitudinal de 2500 a 4400 m.s.n.m, su clima contempla temperaturas que oscilan entre 2 y 16 °C dependiendo de las condiciones topográficas de la zona (Merchán y Peralta, 2020), la cobertura vegetal es principal de paramo en un 61% y se encuentra distribuida en bosque andino, cultivo de pasto, bosques de pino-eucalipto e infraestructura, la precipitación promedio mensual es de 101.54 mm., misma que se la relaciona con la cobertura de paramo existente en la zona. Los suelos del área son principalmente Andisols en un 64%, también están presentes Mollisols e Inseptisols en menor proporción (Belesaca y Peláez, 2018).

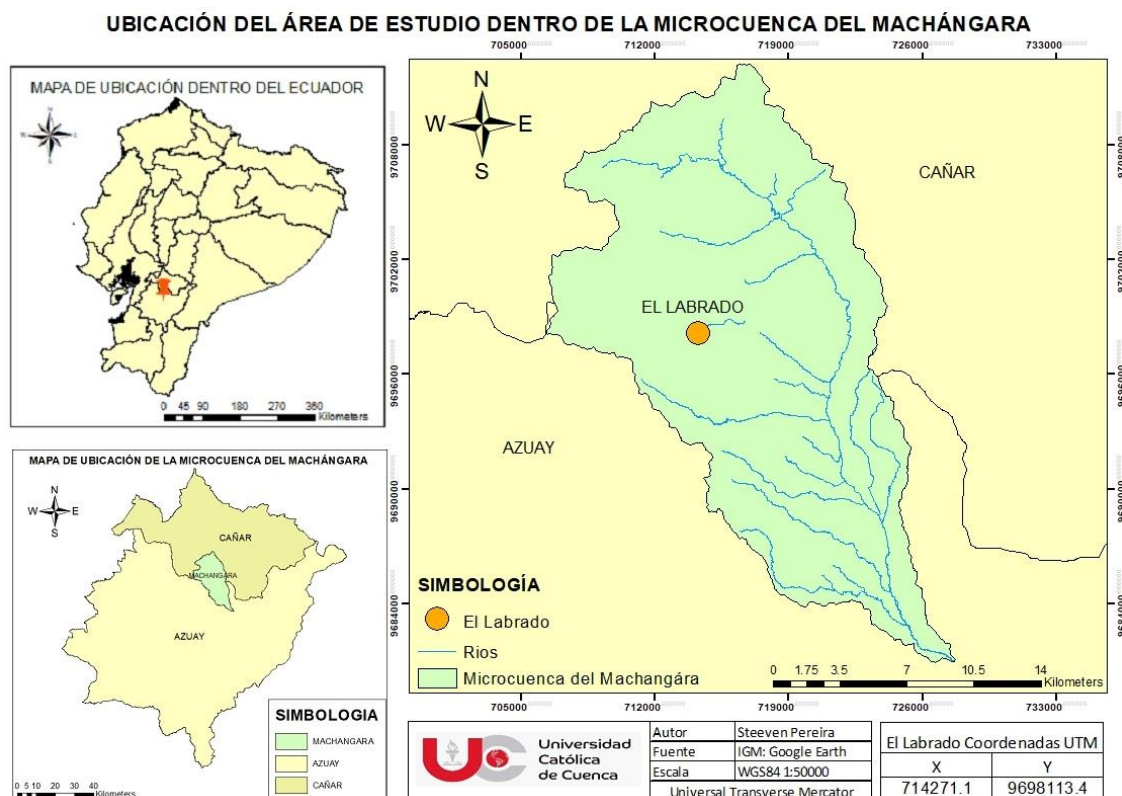


Figura 1. Ubicación de la Microcuenca del Machángara.

Los sitios de muestreo se encuentran ubicados en el sector El Labrado (X=714271.1; Y=9698113.4) a la altura de la cuenca media del río Machángara (3420 m.s.n.m) (figura 2), estos se delimitaron mediante dos parcelas de 10m², ubicadas en el bosque nativo y en el bosque de pino (tabla 1), previamente definidas por el Proyecto CEPRA-XIII-2019-06 “Cambio Climático” y actualmente pertenecen al Observatorio Natural de la Red de Observatorios de la Universidad Católica de Cuenca- RIOUC.

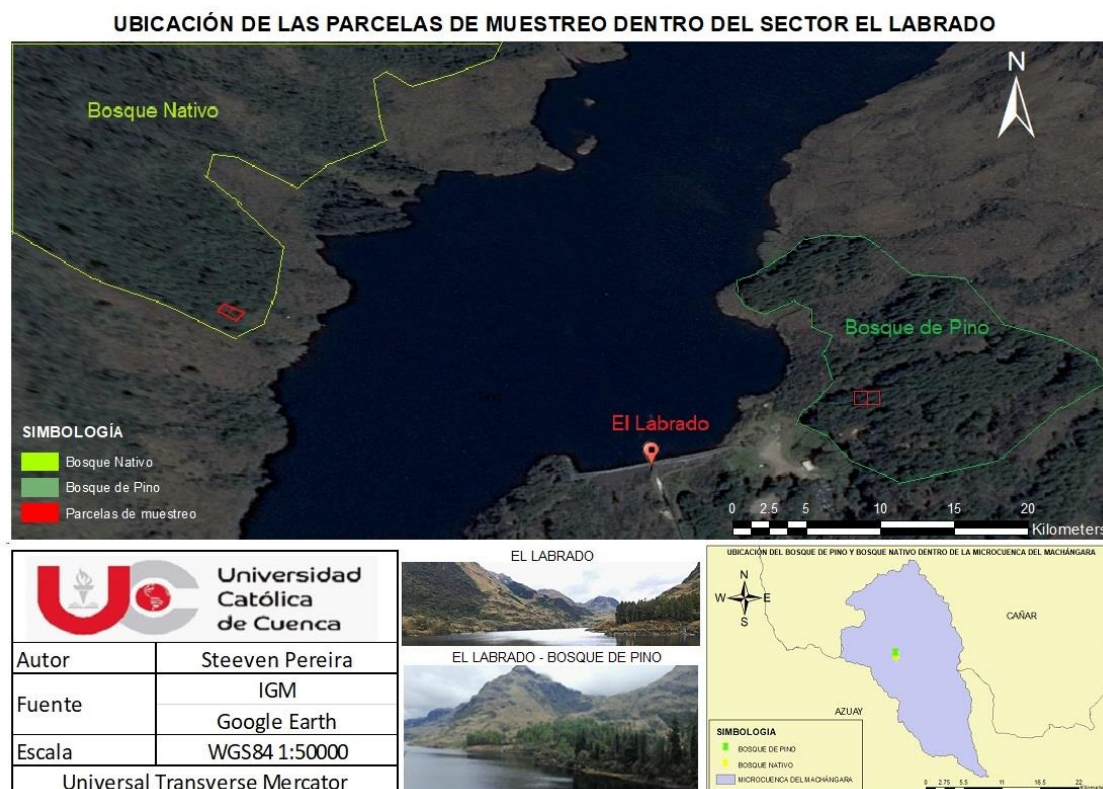


Figura 2. Ubicación de parcelas dentro del sector El Labrado.

Tabla 1: Coordenadas geográficas de parcelas de muestreo.

Coordenadas del bosque de pino		Coordenadas del bosque nativo	
X	Y	X	Y
714107	9698250	714246	9697773
714116.4	9698253.36	714237.26	9697768.14
714116.4	9698263.36	714229.36	9697774.28
714107	9698260	714238.11	9697779.14

3.1.1 Parámetros físico-químicos del área de estudio.

Se registraron mediciones *in situ* de pH y temperatura del suelo de cada una de las parcelas. En la tabla 2, se puede observar que el suelo del bosque de pino tiene pH de 3.6 y una temperatura promedio de 13°C, en tanto que, el bosque nativo presenta un pH de 5.6 y una temperatura promedio de 15°C.

Tabla 2: Parámetros físico químicos del área de estudio

Bosque nativo		Bosque de pino	
pH	Temperatura	pH	Temperatura
5.63	15.36	3.57	12.99

Fuente: (Calle, 2020)

3.2 Cuantificación de bacterias nitrificantes

3.2.1 Colecta de muestra

La colecta de muestras se realizó en el bosque de pino y bosque nativo, donde se seleccionaron diez puntos al azar dentro de las grillas establecidas en cada una de las parcelas, con la finalidad de obtener 10 submuestra de suelo para formar una muestra compuesta.

Para la toma de muestras se siguió la metodología de (Papen y Von Berg, 1998), la cual consistió en remover la capa vegetal superficial, una vez localizado el suelo, se colectó los primeros diez centímetros hasta obtener la cantidad de 1Kg de muestra en cada punto por parcela, las cuales fueron almacenadas en bolsas selladas herméticamente y trasladadas al Centro de Investigación Innovación y Transferencia de Tecnología CIITT para ser procesadas, mediante el método del Número Mas Probable-NMP.

3.2.2 Densidad bacteriana por el NMP

Siguiendo con la metodología propuesta por Papen (1998), se han empleado los medios de cultivos descritos en la tabla 3. Para la preparación de la muestra, se removieron los restos de materia orgánica correspondiente a la capa vegetal del suelo con el fin de obtener una muestra lo más homogénea posible, una vez homogenizada, se pesó 10gr de muestra, para luego ser diluida en 90ml de agua estéril tipo 1.

Tabla 3: Composición de los medios de cultivo para determinar bacterias oxidantes de amonio y nitritos.

Compuesto	Medios de cultivo			
	Cantidades en g/l			
	OAL	OAH	ONL	ONH
NaNO ₂ (Nitrito de sodio)			0,2	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sulfato de magnesio)	0,3	0,3	0,05	0,05
CaCO ₃ (Carbonato de calcio)	7,5	7,5	0,03	0,03
KH ₂ PO ₄ (Fosfato monopotásico)	1	1	0,15	0,15
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Sulfato de hierro)	0,03	0,03	0,00015	0,00015
(NH ₄ ⁺) ₂ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O (Molibdato de amonio tetrahidratado)			0,00005	0,00005
NaCl (Cloruro de sodio)	0,3	0,3	0,5	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sulfato de magnesio)			0,1	0,1
Piruvato de sodio				0,55
Extracto de levadura	1,5	1,5	1,5	1,5
Peptona	1,5	1,5	1,5	1,5
(NH ₄ ⁺) ₂ SO ₄ (Sulfato de amonio)	0,5			
Royo de metilo (0,3%) para cada medio (OAL-OAH-ONL-ONH)				
K ₂ HPO ₄ (Fosfato dipotásico)	1	1		

Descripción de medios (OAL: Oxidantes de Amonio Litoautotróficos; OAH: Oxidantes de Amonio Heterotróficos; ONL: Oxidantes de Nitritos Litoautotróficos; ONH: Oxidantes de Amonio Heterotróficos; pH ONL 8.6: pH OAL, OAH, ONH 7-7.4)

Para la determinación del NMP en el suelo de cada bosque, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-9}) en tubos de ensayo con los medios de cultivo descritos anteriormente, estos se incubaron a 30°C de 3 a 6 semanas. Transcurrido el tiempo de incubación y para determinar la presencia de bacterias nitrificantes, se colocó en una placa microdilución 100 µl de cada dilución y 100 µl de rojo de metilo (tabla 4) se verificó la presencia de bacterias nitrificantes mediante el cambio de coloración a rojo.

De las diluciones del medio de cultivo que se registraron como positivas, se tomó 1 ml y se inoculó en 9 ml de solución salina al 0.85% de NaCl. A partir de esta solución se tomó 5 µl que se colocaron en placas petri con agar nutritivo, previamente divididas en nueve partes correspondientes a cada dilución, estas fueron incubadas a 25°C durante siete días.

Se reviso diariamente el crecimiento de las colonias depositadas en las distintas divisiones, transcurridos tres días se registraron los datos. Estos fueron analizados mediante el software MPN Calculator.

Tabla 4: Compuestos para el indicador rojo de metilo

Compuesto	Cantidad
Rojo de metilo	0.02 g/100ml
Alcohol etílico al 95%	60 ml
Agua destilada tipo 1	40 ml

3.3. Reactivación de cepas bacterianas cultivables:

Las cepas bacterianas del suelo del bosque nativo y bosque de pino de la Microcuenca del Machángara asiladas en el estudio realizado por Calle (2020) y que forman parte del cepario del CIITT, las cuales son pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Buttiauxella*, *Yersinia*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Serratia* y *Mycobacterium* fueron reactivadas y colocadas en una incubadora a 37 °C durante 48 horas. Simultáneamente, al proceso de incubación se preparó agar nutritivo TM MEDIA® para la siembra de las bacterias, este fue preparado según las condiciones del fabricante (Huang et al., 2011).

Una vez realizada la siembra fue incubada durante 6 días, para determinar si existió una correcta reactivación de las cepas (Huang et al., 2011).

3.4. Evaluación del potencial nitrificante

Para la detección del potencial nitrificante se utilizaron medios sólidos, empleando los correspondientes para bacterias litoautótroficas y heterotróficas (tabla 3) adicionando 18gr/l de agar-agar, a estos se les incorporó el indicador rojo de metilo al 0.3% (Elbanna et al., 2012).

Una vez reactivadas las bacterias, se prepararon soluciones stock en solución salina estéril, ajustada al estándar 0,5 de turbidez de la escala de McFarland (Botello 2015).

Siguiendo la metodología sugerida por Botello (2015) se inóculo 5 µl de cada una de las soluciones en cajas petri que contenían los medios de cultivos específicos detallados

anteriormente (dos siembras por placa petri y dos réplicas por aislado), se incubaron a 30°C por un periodo de tiempo de 3 a 6 semanas (Botello et al., 2015).

Posteriormente, se verificó la formación del halo de acidificación, color lila, generado por la reducción de pH, acidificando el medio de cultivo, dicho halo se forma alrededor de cada bacteria aislada (Mahecha, 2011).

Se procedió a realizar la medición del diámetro (cm) de cada halo generado, la cual es una prueba semicuantitativa que reflejó el potencial nitrificante de las bacterias.

3.5. Detección de los productos de oxidación (NO³⁻)

Las cepas que resultaron ser nitrificantes y tuvieron un halo de acidificación superior a 0,5 cm de diámetro, fueron sujetas a la detección de productos de oxidación, en función de los criterios de selección de Botello (2015),

Para ello, se emplearon los medios de cultivos descritos en la tabla 3. Una vez preparados los medios de cultivo, se dispensaron 200 ml para cada cepa en frascos tapa rosca de PP con anillo de vertido sin goteo. Para la incorporación de las cepas a los medios de cultivo, se realizó un inóculo al 2% en solución salina ajustado estándar 0.5 de turbidez de la escala McFarland, posteriormente fueron incubados a 30 °C con agitación constante de 150 rpm en un periodo de 3 a 6 semanas (figura 3).



Figura 3: Shaker con muestras y mecanismo de incubación con sensor de temperatura

La detección de los productos de oxidación NO³⁻ fue desarrollada mediante la técnica de espectrofotometría, empleando el método 8039 de los Estándar Métodos “Cadmium Reduction Method” utilizando el equipo HACH® modelo UV-VIS DR6000 (Hach Company, 2019). Los datos registrados se expresaron como presencia o ausencia del producto de oxidación NO³⁻.

3.6. Aplicación de bacterias nitrificantes en medio sintético rico en productos nitrogenados

Se decidió aplicar las bacterias nitrificantes en un medio sintético con la finalidad de simular condiciones reales de aguas residuales, conociendo que son aguas ricas en productos nitrogenados (Chen et al., 2014), y que las bacterias juegan un rol importante en procesos de biorremediación (Ferrara y Ramírez, 2013).

Para la aplicación se empleó un medio sintético con una cantidad de 376 mg/l NO_2^- con el fin de observar la variabilidad del proceso de nitrificación.

La inoculación de las cepas en el agua sintética, se prepararon soluciones stock ajustadas al 0.5 de turbidez en escala de McFarland y posteriormente fueron inoculadas en 200 ml de agua sintética previamente dispensada en frascos tapa rosca, las muestras fueron incubadas durante 40 días en agitación constante a 150 rpm a una temperatura de 30°C, estos parámetros se adoptaron en función de las condiciones idónea de nitrificación expuestas por Avendaño (2011).

El experimento consistió en testear todas las cepas y su respectiva replica a partir del día 15 con un intervalo de tiempo de 5 días hasta llegar a los 40 días, lo cual generó seis mediciones de NO_2^- las cuales se realizaron mediante espectrofotometría (figura 4 y 5) siguiendo los parámetros del método 8153 "Ferrous Sulfate Method" (Hach Company, 2014).



Figura 4: Preparación de blanco y muestra



Figura 5: Registro de lectura

3.6.1 Tratamiento de datos

Se generó un modelo de regresión lineal con la finalidad de modelar la distribución conjunta de las variables, lo que permite comprender y predecir el comportamiento de las bacterias en un proceso tan complejo como el de la biorremediación, este proceso se lo realizó en función de las metodologías aplicadas por Avendaño (2011) y Chen (2014).

La data recolectada resultante de la aplicación de las cepas bacterianas, se procesó mediante la aplicación de una regresión lineal, empleando el consumo de NO_2^- como variable independiente y el tiempo como variable dependiente, para este proceso se apoyó del software JAMOV, una vez generada la ecuación del modelo se procedió a determinar el índice de ajuste R^2 , el cual nos reflejó que el modelo se ajustaba de mejor manera a ciertas cepas.

Una vez determinada la ecuación, se tomó el valor cuantificable de consumo de NO_2^- de la variable X, mismo que se lo expreso como K_{nit} o cinética de consumo de NO_2^- . Para la determinación del tiempo aproximado de retención celular se realizó la observación directa de la curva de nitrificación, la cual expresa las cantidades de NO_2^- versus el tiempo y a estos resultados se los corrobora con la aplicación del modelo, mismo que genero valores similares con un cierto índice de variabilidad a los reales de la experimentación.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estimación de la densidad bacteriana

Se determinó que el suelo del bosque de pino tiene mayor densidad de bacterias oxidantes de nitritos litoautotróficas con respecto al bosque nativo, 4.2×10^3 y 2.3×10^3 respectivamente con un límite de confianza del 95% (Tabla 5). Esto se pudo evidenciar por el cambio de coloración del medio ONL al añadir el rojo de metilo (Figura 6 y 7), resultado que concuerda con el estudio comparativo de propiedades edáficas de una plantación forestal de *Pinus sp.* realizado por Gómez (2011) donde señala que las bacterias funcionales específicas como las bacterias oxidantes de nitrito tienen una mayor densidad dentro de este tipo de suelos. Por otro lado, Mahecha (2011) expone que la presencia de este tipo plantaciones, no influye en el desarrollo de bacterias nitrificantes, pese a que acidifica el pH del suelo. Con respecto a la densidad bacteriana del suelo de un bosque nativo Gómez (2011) señala que además de la presencia de bacterias oxidantes de nitrito existen otras bacterias funcionales que no son cultivables.

Tabla 5: Resultados de densidad bacteriana

Suelo	Fenotipo	NMP/gr	Límite de confianza 95% NMP/g	
			Inferior	Superior
Bosque de pino	BON: Lit	4.2×10^3	1×10^3	1.7×10^4
Bosque nativo	BON: Lit	2.3×10^3	6.6×10^2	8×10^3

Descripción (BON: Bacterias Oxidantes de Nitritos; Lit: Litoautotróficos)

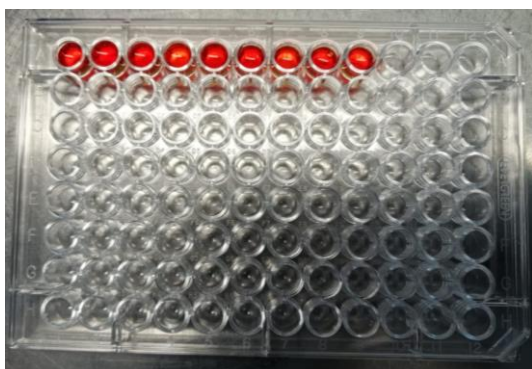


Figura 6: Placa de microdilución bosque nativo. (Resultado positivo en placa de microdilución de bacterias nitrificantes del suelo del bosque de nativo en medio ONL a las 6 semanas de incubación)

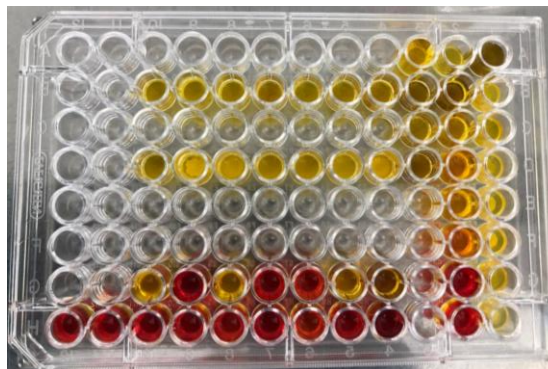


Figura 7: Placa de microdilución bosque de pino. (Resultado positivo (rojo) en placa de microdilución de bacterias nitrificantes del suelo del bosque de pino en medio ONL a las 3 semanas de incubación)

4.2. Determinación de potencial nitrificante

Se reactivaron 12 cepas según la metodología propuesta (tabla 6), 5 fueron aisladas del suelo del bosque de pino, 6 del suelo del bosque nativo, y una cepa compartida, atribuyéndose su presencia en los dos bosques, a que al encontrarse en el tracto digestivo de los animales y al existir conexión entre los ecosistemas en estudio esta puede ser portada por la fauna local según Calle (2020).

Tabla 6: Cepas bacterianas aisladas del suelo del bosque nativo y bosque de pino.

CEPA	GÉNERO	SITIO	
		BP	BN
A1	<i>Aeromonas encheleia</i>	x	x
A6	<i>Buttiauxella ferraguliae</i>		x
A19	<i>Buttiauxella gaviniae</i>		x
G23	<i>Yersinia enterocolitica</i>		x
C2(2)	<i>Paenibacillus stellifer</i>		x
B1R14	<i>Serratia proteamaculans</i>		x
C2-1	<i>Serratia plymuthica</i>		x
b3R	<i>Bacillus pumillus</i>	x	
b5R	<i>Aeromonas molluscorum</i>	x	
b17R	<i>Bacillus muralis</i>	x	
f2	<i>Mycobacterium sp.</i>	x	
b2R9	<i>Yersinia kristensenii</i>	x	

Descripción (BP: Bosque de pino; BN: Bosque nativo)

La presencia del halo de acidificación permitió determinar que 10 de las 12 cepas: *Buttiauxella ferraguliae*, *Buttiauxella gaviniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia plymuthica* pertenecientes al bosque nativo y *Bacillus pumillus*, *Aeromonas molluscorum*, *Bacillus muralis*, *Mycobacterium sp.* y *Yersinia kristensenii* pertenecientes al bosque de pino, así como la *Aeromonas encheleia* que tiene presencia en los dos bosques, poseen un potencial nitrificante (tabla 7). La bacteria *S. plymuthica* fue una de las más significativas en tanto al diámetro de su halo de acidificación 1.6 cm, el mismo que se puede observar en la figura 10, verificando el potencial nitrificante, el cual fue confirmado por Hamel (2004) es su estudio del impacto de los microorganismos en el ciclo de N, donde se le atribuye al género *Serratia* como bacterias nitrificantes.

La cepa *Y. enterocolitica* tuvo un diámetro considerable 1.3 cm (figura 7). Los halos de acidificación del resto de cepas oscilan entre 1 y 1.2 cm. Siendo la *A. encheleia* la que cuenta con el menor halo de 1 cm. Las cepas *Serratia proteamaculans* y *Paenibacillus stefellifer* pertenecientes al bosque nativo no formaron halos de

acidificación, pese a ser reportado el género *Serratia* como nitrificante por Mpongwana (2016). Por otra parte la ausencia del halo de acidificación del género *Paenibacillus* tiene relación con el estudio de Silva (2014) referente a la reducción de nitratos por aislados bacterianos, en el cual el género *Paenibacillus* es reportado como desnitrificante.

Tabla 7: Cepas con potencial nitrificante y medición del halo de acidificación

CEPA	DIÁMETRO (cm)		GENERO	LUGAR	
	ONL			BP	BN
b3R	1.1		<i>Bacillus pumilus</i>	x	
b2R9	1.2		<i>Yersinia kristensenii</i>	x	
b1R14	-		<i>Serratia proteamaculans</i>		x
G23	1.3		<i>Yersinia enterocolítica</i>		x
A1	1.0		<i>Aeromonas encheleia</i>	x	x
C2(2)	-		<i>Paenibacillus stefellifer</i>		x
b5R	1.1		<i>Aeromonas molluscorum</i>	x	
C2-1	1.6		<i>Serratia plymuthica</i>		x
A19	1.3		<i>Buttiauxella gaviniae</i>		x
b17R	1.1		<i>Bacillus muralis</i>	x	
A6	1.1		<i>Buttiauxella ferraguliae</i>		x
f2	1.2		<i>Mycobacterium sp</i>	x	

Descripción (BP: Bosque de pino; BN: Bosque nativo)

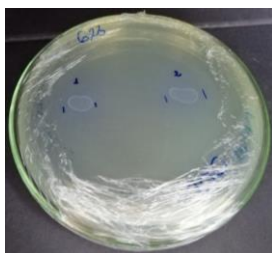


Figura 8: Halo de acidificación *Y. enterocolítica*

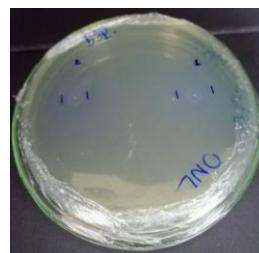


Figura 9: Halo de acidificación *B. pumilus*



Figura 10: Halo de acidificación *S. plymuthica*

El género *Bacillus* fue nitrificante por la presencia del halo de acidificación en las dos especies evaluadas con un diámetro de 1.1 cm. (figura 9). Los *Bacillus* fueron reportados por Sakai (1997) como nitrificante en su estudio sobre oxidación y reducción de nitritos, el autor asume que las bacterias de este género son facultativas ya que aportan en el proceso de nitrificación y desnitrificación, lo que es confirmado por Mekuto (2015) mediante un proceso de biorremediación empleado consorcios de *Bacillus sp.*, alcanzó la nitrificación y desnitrificación en una sola etapa. Botello (2015) también menciona a este género como nitrificante en su estudio sobre la detección de potencial nitrificante de aislados bacterianos, el mismo que tuvo la característica de ser oxidante de NH_4^+ .

El género *Mycobacterium* también presentó potencial nitrificante lo cual según De Oliveira (2010) en su estudio de eficiencia del uso de bacterias en el proceso de tratamiento de efluentes, este género interviene en la nitrificación y desnitrificación, presumiendo su comportamiento facultativo.

En el estudio de Mpongwana (2016) sobre bacterias tolerantes a la salinidad para la nitrificación y desnitrificación aeróbica en condiciones de cianogénesis, en el cual se afirma el potencial nitrificante del género *Yersinia* y *Serratia*, debido a la capacidad de oxidación de NO_2^- lo cual valida el estudio de Hamel (2004) en referencia a la *Serratia plymuthica*.

El género *Aeromonas* ha sido probado por Chen (2014) en procesos de nitrificación y desnitrificación aplicado en aguas residuales, con la finalidad de reducir el NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- en condiciones extremas, lo cual valida el potencial nitrificante de este género, y su comportamiento facultativo.

Quintero (2011) en su estudio resalta la capacidad de oxidación de NO_2^- del género *Buttiauxella*, al igual que Mpongwana (2016) el cual probó la capacidad de degradación de NH_4^+ y NO_2^- de bacterias del orden *Enterobacteriales* a las cuales pertenece el género *Buttiauxella*, resultando ser facultativas.

4.3. Estimación de productos de oxidación

Se determinó la presencia o ausencia de productos de oxidación NO_3^- resultantes del proceso de nitrificación prueba que evidenció el potencial nitrificante de las cepas evaluadas (Tabla 8), en referencia a estos datos podemos decir que autores como Mpongwana (2016), Chen (2014) y Mekuto (2015) registran resultados similares en cuanto a los géneros evaluados, afirmando la capacidad de oxidación de NO_2^- y en ciertos

estudios evaluándolos como potenciales oxidantes de NH_4^+ , realizando dos pasos de la nitrificación hasta llegar a la presencia de NO_3^- .

Tabla 8: Estimación de presencia de productos de oxidación

CEPA	GÉNERO	P/A	PRODUCTOS DE OXIDACIÓN	
			Fenotipo	
			BON	BOA
b3R	<i>Bacillus pumilus</i>	P	x	
b2R9	<i>Yersenia kristensenii</i>	P	x	
G23	<i>Yersenia enterocolítica</i>	P	x	
A1	<i>Aeromona encheleia</i>	P	x	
b5R	<i>Aeromonas molluscorum</i>	P	x	
C2-1	<i>Serratia plymuthica</i>	P	x	
A19	<i>Buttiavexella gaviniae</i>	P	x	
b17R	<i>Bacillus muralis</i>	P	x	
A6	<i>Buttiavexella ferraguliae</i>	P	x	
f2	<i>Mycobacterium sp</i>	P	x	

Descripción (P: Presencias; A: Ausencia)

4.4. Aplicación de bacterias nitrificantes en medio sintético rico en productos nitrogenados.

4.4.1 Disminución de los niveles de NO_2^-

Al analizar las lecturas de NO_2^- (Anexo 5) se generaron las curvas de oxidación de NO_2^- referentes para cada cepa (figura 11, 12, 13), poniendo en evidencia que todas las cepas evaluadas tienen la capacidad de oxidar NO_2^- , con diferente eficiencia, siendo la más eficiente la cepa *S. plymuthica*, con un porcentaje promedio de reducción de nitritos de 87.68% hasta el 99.96% llevando la concentración inicial de 376 mg/l hasta 0 mg/l en el día 40.

Desde una perspectiva más general, en cuanto al comportamiento, se observaron diferencias muy marcadas entre las cepas e incluso entre sus réplicas, las únicas cepas que mantuvieron un comportamiento similar entre sus réplicas fueron *Mycobacterium sp.* y *S. plymuthica* (figura 11), lo que posiblemente indicaría un desarrollo poblacional similar dicho comportamiento concuerda con Herrera (2020) quien señala que al existir poblaciones similares en las mismas condiciones, los modelos resultantes serán equiparables.

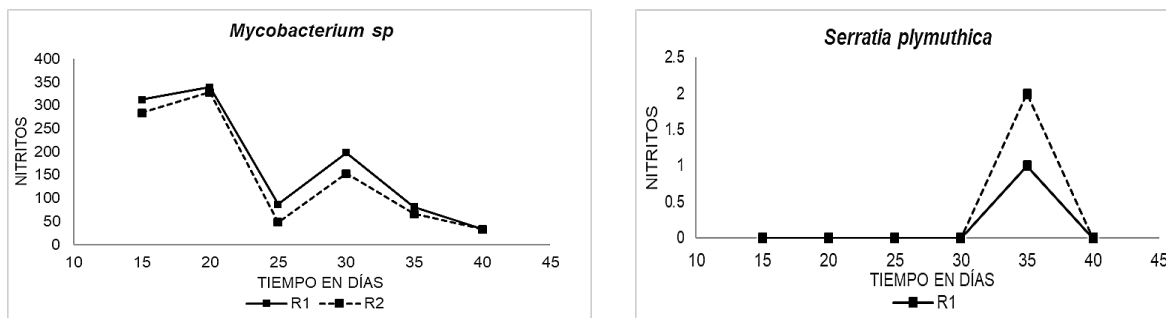


Figura 11: Curvas de oxidación de NO_2^- *Mycobacterium sp.* y *S. plymuthica*

Cabe resaltar que se observaron aumentos en las cantidades de NO_2^- durante el periodo de evaluación y el pico más alto registrado fue para la cepa *B. ferruguliae* llegando hasta los 572 mg/l. La cepa *B. pumillus* en una de sus réplicas presentó en el día 40 un aumento exponencial la cantidad de NO_2^- alcanzando su valor máximo de 68 mg/l (figura 12).

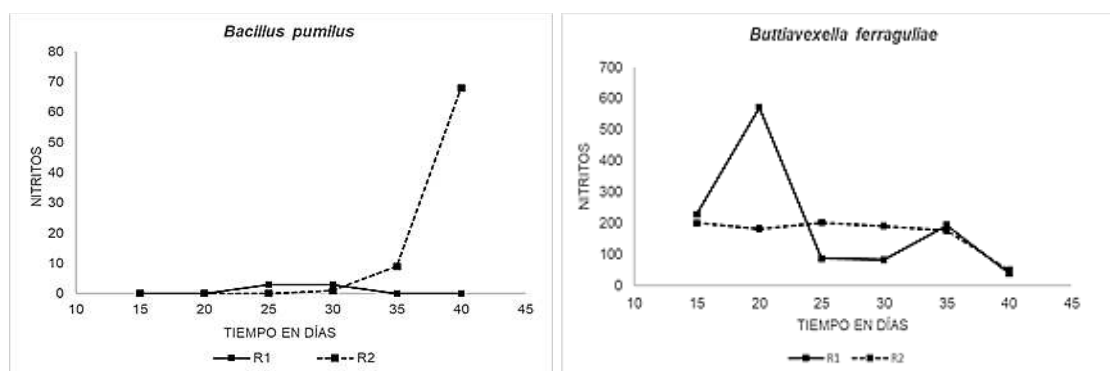


Figura 12: Curvas de oxidación de NO_2^- *B. pumillus* y *B. ferruguliae*

Se presume que este tipo de comportamientos son atribuibles a la presencia de características facultativas en los géneros evaluados, en referencia a esta hipótesis, estudios como los de Mpongwana (2016), Mekuto (2015), Quintero (2011), Sakai (1997), Hamel (2004), Castillo (2016) y De Oliveira (2010), atribuyen características facultativas a las bacterias dentro de los géneros *Aeromonas*, *Buttiauxella*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Serratia* y *Mycobacterium*, debido a que estos se pueden desarrollar en condiciones aerobias y anóxicas.

Se sospecha que el aumento detectado en las cantidades de NO_2^- se generó por el caos existente en el sistema. En referencia a este comportamiento Chen (2014) en su estudio señala que el consumo de NO_2^- es referente al crecimiento poblacional en función del tiempo, teniendo una amplia variabilidad y susceptibilidad según las condiciones existentes, un crecimiento exponencial conlleva a un consumo total de los recursos energético, hasta llegar a un punto de caos, en el cual se elevan las cantidades de NH_4^+ por los altos índices de mortalidad existentes, aportando a la formación de materia

orgánica, volviendo a formar parte del ciclo del N. Castillo (2016) menciona que dentro de los sistemas en proceso de caos, se evidencian grados de organización que promueven el correcto funcionamiento pese a las perturbaciones existentes. Graham (2007) demostró en su estudio sobre la inestabilidad en la nitrificación biológica, que la ocurrencia de caos es vital para la estabilización de la nitrificación, debido al frágil mutualismo entre las bacterias oxidantes de amonio y bacterias oxidantes de nitritos.

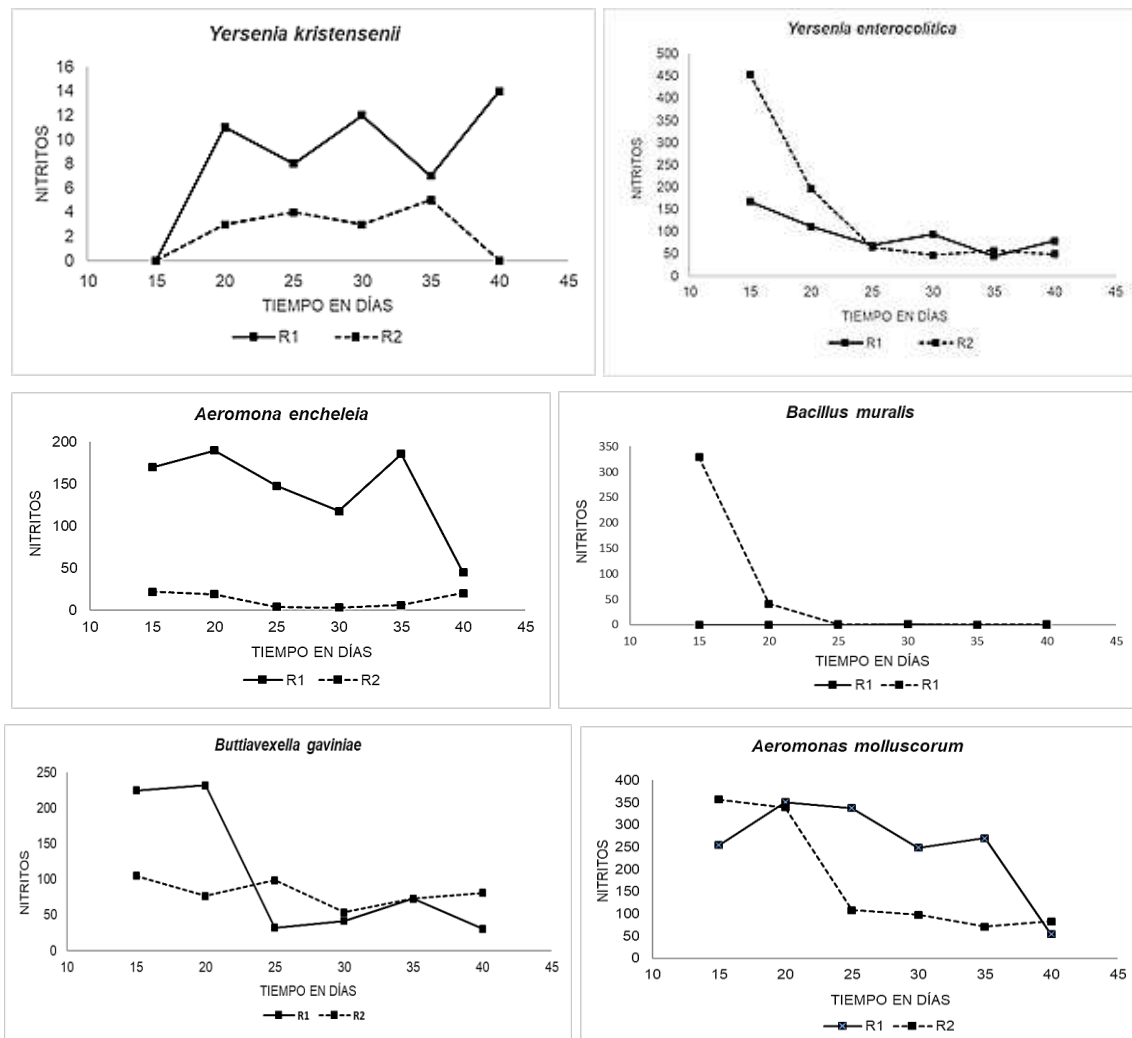


Figura 13: Curvas de oxidación de NO_2^-

4.4.2 Modelación del comportamiento

Mediante regresión lineal empleando las variables de oxidación de NO_2^- y el tiempo, se pudo estimar el comportamiento en el proceso de oxidación de NO_2^- de cada una de las cepas, detallado por las ecuaciones expuestas en la tabla 9, de estas se puede resaltar que la cepa f2-*Mycobacterium sp* en su réplica 1 ($R^2 = 0.73$) y b5R- *Aeromonas molluscorum* en su réplica 2 ($R^2 = 0.76$) tuvieron el mejor ajuste a un modelo lineal, ya que su valor de R^2 fue el más aproximado a 1. Por otro lado, cepas como b3R- *Bacillus pumilus*

y b2R9- *Yersinia kristensenii* tuvieron los valores de R^2 más bajos, esto se podría deber a que al mantenerse en cantidades bajas de NO_2^- la variabilidad de los datos no es perceptible por el modelo, pero dicho comportamiento sigue la tendencia de la otra réplica. Según el estudio propuesto por Villazón (2020) donde al realizar un modelo de calidad del agua y modelar los NO_2^- , los coeficientes de ajustes son similares al modelo propuesto, exceptuando la cepa b3R- *Bacillus pumilus* en su réplica 1.

Las tasas o cinéticas de consumo de NO_2^- (K_{nit}) (tabla 9) refleja una disminución de nitritos, evidenciando el proceso de oxidación realizado por las cepas, registrándose valores negativos, dentro de las K_{nit} se destacaron las cepas G23- *Yersinia enterocolitica* en su réplica 2 ($K_{\text{nit}} = -14.06 \text{ mg/l*d}$) y f2 en su réplica 1 ($K_{\text{nit}} = -11.76 \text{ mg/l*d}$) mismas que tuvieron un buen ajuste al modelo propuesto. Cabe considerar, por otra parte las K_{nit} que fueron positivas, lo cual resultaría en un incremento de NO_2^- en el sistema, un ejemplo de esto es la cepa C2-1- *Serratia plymuthica* ($R1K_{\text{nit}} = 0.02 \text{ mg/l*d}$) ($R2K_{\text{nit}} = 0.03 \text{ mg/l*d}$) dicho comportamiento se podría ver reflejado en el caos dentro del sistema lo cual es mencionado por Castillo (2016) y Graham (2007). Otra posible causa, podría ser la presencia de características facultativas de las cepas, autores como Mpongwana (2016) y Mekuto (2015) atribuyen este tipo de características a especies del género *Bacillus*, *Yersinia* y *Serratia*.

Tabla 9: Resultados de regresión lineal de las cepas evaluadas

CEPA	REPLICA	ECUACIÓN	R^2	$K_{\text{nit}} \text{ (mg/l*d)}$	$\theta_c \text{ (d)}$
f2	R1	$y = -11.76x + 498.4$	0.73	-11.76	25
f2	R2	$y = -11.063x + 456.23$	0.66	-11.06	25
b2R9	R1	$y = 0.3543x - 1.076$	0.45	0.35	25
b2R9	R2	$y = 0.0286x + 1.7143$	0.02	0.03	20
A6	R1	$y = -11.909x + 528.49$	0.33	-11.91	40
A6	R2	$y = -4.48x + 291.2$	0.52	-4.48	40
b3R	R1	$y = -3.18 \times 10^{-17}x + 1$	0	(-3.18×10^{-17})	20
b3R	R2	$y = 2.1029x - 44.82$	0.52	2.10	20
b5R	R1	$y = -7.6114x + 461.65$	0.45	-7.61	40
b5R	R2	$y = -12.48x + 519.2$	0.76	-12.48	35
b17R	R1	$y = 5.71 \times 10^{-3}x + 9.52 \times 10^{-3}$	0.02	5.71×10^{-3}	20
b17R	R2	$y = -10.074x + 339.21$	0.51	-10.07	25
G23	R1	$y = -3.5314x + 191.45$	0.61	-3.53	25
G23	R2	$y = -14.057x + 531.24$	0.66	-14.06	30
C2-1	R1	$y = 0.0171x - 0.304$	0.15	0.02	20
C2-1	R2	$y = 0.0343x - 0.609$	0.15	0.03	25
A19	R1	$y = -8.2114x + 331.65$	0.64	-8.21	25
A19	R2	$y = -1.0114x + 109.31$	0.26	-1.01	30
A1	R1	$y = -3.8114x + 247.65$	0.42	-3.81	40
A1	R2	$y = -0.2857x + 20.19$	0.09	-0.29	25

Descripción (R^2 : Coeficiente ajuste del modelo $p \leq 1$ y $p > 0$; K_{nit} : Cinética de consumo de NO_2^- ; θ_c (d): Retención celular en días)

Se pudo estimar los tiempos de retención celular (θ_c) (tabla 9) para cada cepa, para la cepa b3R- *Bacillus pumilus* se estimó el mismo θ_c entre sus réplicas, dicho dato indicaría que en aproximadamente 20 días esta cepa lograría su máxima oxidación de NO_2^- en un sistema, concordando con el tiempo de retención promedio para el tratamiento de aguas residuales propuesto por Claros (2012) en su estudio referente al tratamiento biológico de aguas residuales con alta carga de N amoniacal. Por otra parte, se evidenciaron θ_c de 40 días como el registrado por la cepa A6- *Buttiauxella ferraguliae* logrando su máxima capacidad de oxidación de NO_2^- en dicho tiempo. Debido a las diversas fluctuaciones existentes en el proceso de nitrificación, este dato indicaría que al aplicarse esta especie en un tratamiento aerobio o anaerobio de aguas residuales tendría un costo elevado.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

El bosque nativo presentó mayor densidad bacteriana 4.2×10^3 NPM/gr que el bosque de pino, aunque esta diferencia no fue significativa.

Las bacterias cultivables aisladas del suelo de los sitios de estudio presentaron un potencial nitrificante prometedor para su posible aplicación en procesos de biorremediación de agua residuales y/o lixiviados. Destacando las bacterias *Serratia plymuthica*, *Buttiauxella gaviniae* que presentaron un mayor diámetro en su halo de nitrificación.

Se logró evidenciar la presencia de productos de oxidación (NO^{3-}) en diez de las doce cepas evaluadas, mismas que presentaron potencial nitrificante, esto es un indicador que estas cepas están participando en el proceso de oxidación de nitritos.

En la aplicación de las bacterias en el medio sintético se pudo determinar su comportamiento en el proceso de nitrificación, los resultados obtenidos sugirieron la presencia de características facultativas, lo que posiblemente permitirían a las bacterias realizar el primer paso de la desnitrificación de NO^{3-} a NO^{2-} en un proceso de biorremediación.

Las bacterias *Serratia plymuthica* y *Bacillus pumillus* presentaron mayor eficiencia en el proceso de nitrificación, mismas que realizaron la oxidación total o parcial de los nitritos, alcanzando porcentajes de reducción de NO^{2-} de hasta el 99.96%.

CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

Los tiempos de muestreo para la evaluación del proceso de oxidación deben ser cortos, no más allá de 24 horas, esto con el fin de poder determinar en qué fase de la nitrificación se encuentran las bacterias nitrificantes, en el caso de presentar características facultativas.

Para futuros estudios referentes a la aplicación de bacterias nitrificantes se deben contrastar los tres parámetros principales de la nitrificación amonio, nitritos y nitratos.

El tratamiento biológico de aguas residuales empleando bacterias nitrificantes deberá ser complementado con tratamientos físicos para poder abarcar una mejor disminución de contaminantes.

Se debería probar la eficiencia de las bacterias nitrificantes dentro de procesos de biorremediación de suelos con altas cantidades de productos nitrogenados, mismas que se podrían incorporar como un agente regulador de este tipo de contaminantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A. (1999). Quantification of soil nitrites in an oil palm field in the colombian eastern plains and their relation with rainfall, spatial variability and chisel plowing. *Palmas*, 20(4), 11–17.
- Almudena, A. y Lizaso, J. (2001). Nitritos, Nitratos Y Nitrosaminas. En Fundación Ibérica Para La Seguridad Alimentaria (Ed.), *Primer Seminario Internacional Fundisa sobre seguridad alimentaria*.
https://www.academia.edu/25921074/FUNDACIÓN_IBÉRICA_PARA_LA_SEGURIDAD_ALIMENTARIA?from=cover_page
- Andreu, J., Betrán, J., Delgado, I., Espada, J., Gil, M., Gutiérrez, M., Iguácel, F., Isla, R., Muñoz, F., Orús, F., Pérez, M., Quílez, D., Sin, E. y Yagüe, M. (2006). El uso intensivo de fertilizantes y estiércoles puede ocasionar problemas medioambientales si no se respeta el equilibrio de todo el sistema. *Gobierno de Aragón - Departamento de Agricultura y Alimentación - Editoriales Cometa, S.A.*
- Avendaño, 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* [Trabajo Fin de Máster, Universidad Politécnica de Valencia]. Repositorio Académico de la Universidad Politécnica de Valencia
- Bear, R. y Snyder, B. (2015). *El ciclo del nitrógeno*. Khan Academy.
<https://es.khanacademy.org/science/biology/ecology/biogeochemical-cycles/a/the-nitrogen-cycle>
- Botello, S. W., Puerto, M. D., Montes, V. D. y Rodas, M. E. (2015). Detection and evaluation of nitrifying potential of bacterial isolates associated to rhizosphere of three macrophyte. *Revista Colombiana De Ciencia Animal*, 6(2), 358–362.
- Bussmann, R. W. (2005). Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso. *Revista Peruana de Biología*, 12(2), 203–216.
<https://doi.org/10.15381/rpb.v12i2.2394>
- Calle, J. (2020). *Estudio comparativo de la comunidad bacteriana cultivable del bosque nativo y bosque de pino dentro de la microcuenca del Machángara* [Trabajo fin de grado Ingeniero Ambiental. Universidad Católica de Cuenca]. Repositorio Académico

de la Universidad Católica de Cuenca

- Castillo, D. (2016). Influencia del substrato e inóculos microbios anaeróbios facultativos y metanogénicos de una fermentación discontinua para la producción de biogás en condiciones naturales, Tacna, Perú, 2012 - 2015 [Tesis Doctoral, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann- Tacna]. En *Journal of Visual Languages & Computing* (Vol. 11, Número 3). https://www.m-culture.go.th/mculture_th/download/king9/Glossary_about_HM_King_Bhumibol_Adulyadej's_Funeral.pdf
- Cerón, L. y Aristizábal, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos Nitrogen and phosphorus cycles dynamics in soils. *Revista Colombiana Biotecnología*, XIV(1), 285–295. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77624081026%0ACómo>
- Chen, M., Wang, W., Feng, Y., Zhu, X., Zhou, H., Tan, Z. y Li, X. (2014). Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresource Technology*, 167, 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.001>
- Chen, Q. y Ni, J. (2011). Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1305–1310. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0911-6>
- Claros, J. (2012). Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal [Tesis Doctoral, Universidad Politécnica De Valencia]. En *Repositorio Académico de Universidad Politécnica De Valencia* (Vols. 601–602). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.177>
- Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A. y Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55–81. <https://doi.org/10.22490/24629448.1717>
- De Oliveira, G. (2010). *Trabalho de Conclusão de Curso Eficiência da Utilização de Bactérias no Processo de Tratamento de Efluentes (ETE)* [Trabalho de curso licenciado no curso de Ciências Biológicas. Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix]. <https://www.metodista.br/revistas/revistas-izabela/index.php/aic/article/download/544/451>

- Elbanna, K. H., El-Shahawy, R. M. y Atalla, K. M. (2012). A new simple method for the enumeration of nitrifying bacteria in different environments. *Plant, Soil and Environment*, 58(1), 49–53. <https://doi.org/10.17221/412/2011-pse>
- Ferrara, G. y Ramírez, A. (2013). Análisis de la sedimentabilidad de los lodos biológicos producidos en un RCS durante la desnitrificación de un efluente de un biorreactor de crecimiento adherido. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, 28(1), 37–44. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-40652013000100005&script=sci_abstract
- García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Revista pedagógica de la Universidad de Salamanca*, 3, 173–186.
- Gómez, M. (2011). *Comparación de propiedades edáficas y procesos ecosistémicos entre plantaciones forestales y bosques secundarios subandinos* [Trabajo fin de Magister, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Académico de la Universidad Nacional de Colombia
- Graham, D. W., Knapp, C. W., Van Vleck, E. S., Bloor, K., Lane, T. B. y Graham, C. E. (2007). Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME Journal*, 1(5), 385–393. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.45>
- Hach Company. (2014). Nitrite Method 8153: Ferrous Sulfate Method (DOC316.53.01075). En *Hach Company World Headquarters* (Número 3).
- Hach Company. (2019). Nitrate Method 8039: Cadmium Reduction Method (DOC316.53.01066). En *Hach Company World Headquarters* (Vol. 584, Número 10).
- Hamel, C. (2004). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on N and P cycling in the root zone. *Canadian Journal of Soil Science*, 84(4), 383–395. <https://doi.org/10.4141/S04-004>
- Herrera, J. (2020). *Simulación basada en el individuo utilizando Netlogo de un reactor discontinuo de lodos activados en fase aerobia y anaerobia*. [Trabajo fin de grado Ingeniero Químico. Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/21431/1/T-UCE-0017-IQU-087.pdf>
- Huang, J. J., Hu, H. Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S. Q. y Lu, Y. (2011). Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 45(9), 2775–2781. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.026>

- Lamprea, A., Herrera, N., Buitrago, J. y Ramirez, Y. (2015). El Nitrógeno, Ciclo Biogeoquímico. *Universidad Distrital Francisco José de Caldas*, 1–10. https://www.academia.edu/37164150/El_Nitrógeno_Ciclo_Biogeoquímico
- Mahecha, S. (2011). Comparación de la densidad y actividad bacteriana fijadora libre de nitrógeno entre tres usos de suelo (Cuenca del Otún, Risaralda) [Trabajo fin de grado Carrera Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana]. En *Repositorio Académico de la Pontificia Universidad Javeriana*. <http://hdl.handle.net/10554/8833>
- Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O. y Jackson, V. A. (2015). Biodegradation of free cyanide and subsequent utilisation of biodegradation by-products by *Bacillus* consortia: Optimisation using response surface methodology. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10434–10443. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4221-4>
- Mendoza, M., Lizarazo, J. E., Aranguren, L. M. y Javier, R. N. (2019). Bacterias nitrificantes cultivables de la zona limnética del lago de Tota, Boyacá. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1378>
- Mpongwana, N., Ntwampe, S. K. O., Mekuto, L., Akinpelu, E. A., Dyantyi, S. y Mpentshu, Y. (2016). Isolation of high-salinity-tolerant bacterial strains, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Yersinia* sp., for nitrification and aerobic denitrification under cyanogenic conditions. *Water Science and Technology*, 73(9), 2168–2175. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.070>
- Myrold, D. y Posavatz, N. (2007). Potential importance of bacteria and fungi in nitrate assimilation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1737–1743. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.033>
- Pacheco, J., Pat Canul, R. y Cabrera, A. (2002). Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Revista Académica Ingeniería*, 6(3), 73–81. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46760308>
- Padrón, D. y Vázquez, O. (2019). *Caracterización y zonificación de la microcuenca del río Machángara para estudios de procesos biogeoquímicos e isótopos estables de carbono, nitrógeno, hidrogen y oxígeno* [Trabajo fin de grado Biólogo. Universidad del Azuay]. Repositorio Académico de la Universidad del Azuay
- Papen, H. y Von Berg, R. (1998). A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant and Soil*, 199(1), 123–130. <https://doi.org/10.1023/A:1004243810473>

- Quintero, A. (2011). Microorganisms in concrete [Trabajo fin de grado Ingeniero Ambiental. Universidad de los Andes]. En *Repositorio Académico de la Universidad de los Andes*. <http://hdl.handle.net/1992/24706>
- Rodríguez, A. R., Inchaustegui, S. M., Castro, L. P., Montealegre, R. J. y Vargas, J. P. H. (2017). Aislamiento de cepas bacterianas oxidantes de amonio y nitrito del suelo y su uso potencial en la reducción de nitrógeno en las aguas residuales domésticas. *Revista de Biología Tropical*, 65(4), 1527–1539. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i4.26509>
- Sakai, K., Nakamura, K., Wakayama, M. y Moriguchi, M. (1997). Change in nitrite conversion direction from oxidation to reduction in heterotrophic bacteria depending on the aeration conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82785-7](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82785-7)
- Sepúlveda, A., González, E. y Inostroza, C. (2012). Remediation of nitrate pollution in soil: general background and relevance in southern Chile. *Gestión Ambiental*, 21, 12–32. <https://www.researchgate.net/publication/280579834%0AREMEDIACIÓN>
- Silva, F. D. J., Cássia, R., Ribeiro, F., Larisse, G., Dorasio, O. y Aparecida, A. (2014). Redução de Nitrato por Rizobactérias Isoladas de Raízes de Bananeira Material e métodos Resultados e Discussão Conclusão. *FEPEG*, 3, 8–10. http://www.fepeg2014.unimontes.br/sites/default/files/resumos/arquivo_pdf_anais/avaliacao_da_reducao_do_nitrato_por_rizobacterias_-_fabiola_ii.pdf
- Singh, S. y Bakshi, B. R. (2013). Accounting for the biogeochemical cycle of nitrogen in input-output life cycle assessment. *Environmental Science and Technology*, 47(16), 9388–9396. <https://doi.org/10.1021/es4009757>
- Tumiri, L. (2017). *Importancia de las bacterias nitrificantes en los suelos*. natzone. <http://www.natzone.org/index.php/areas-de-investigacion/educacion-ambiental/item/192-importancia-de-las-bacterias-nitrificantes-en-los-suelos>
- Villazón, M. F., Gabriel, T. F., Mayor, U., Simón, D. S. y Hidráulica, L. De. (2020). Numerical Modeling of Water Quality in the Rocha River in the Section Between the Siles Bridge and the Killman Bridge. *Acta Nova*, 9(4), 592–617. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-07892020000100008

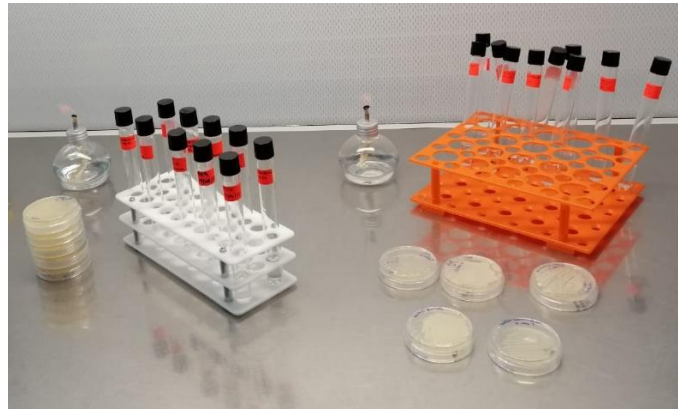
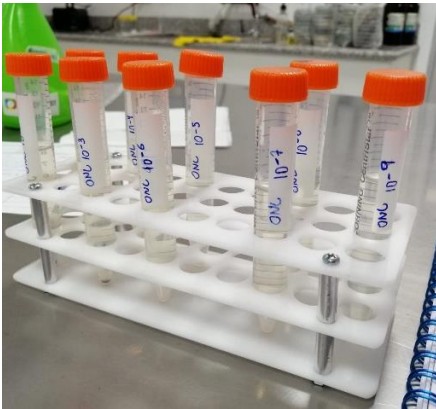
ANEXOS

Anexo 1: Colecta de muestras de suelo

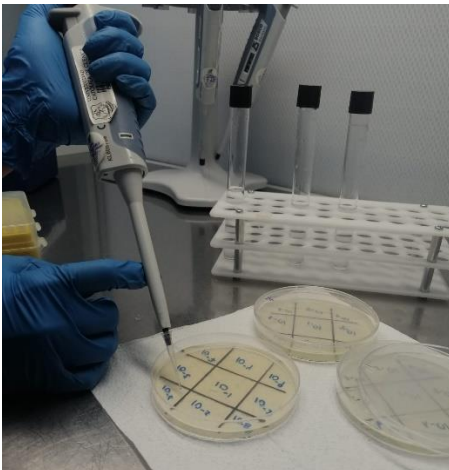


Descripción: Colecta de muestras de suelo in situ y almacenamiento

Anexo 2: Densidad bacteriana



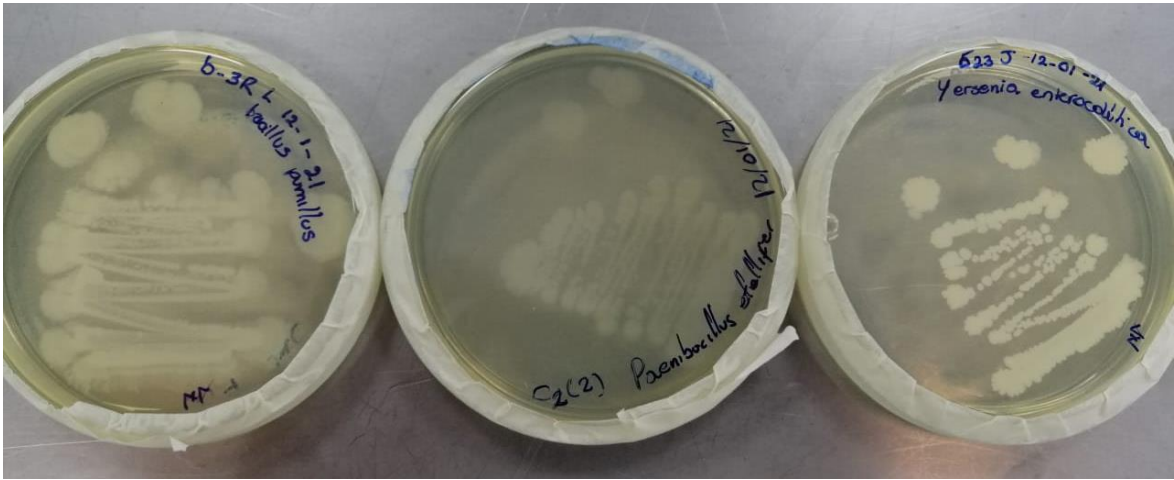
Descripción: Muestras de suelo inoculadas en medios de cultivo y siembra en solución salina.



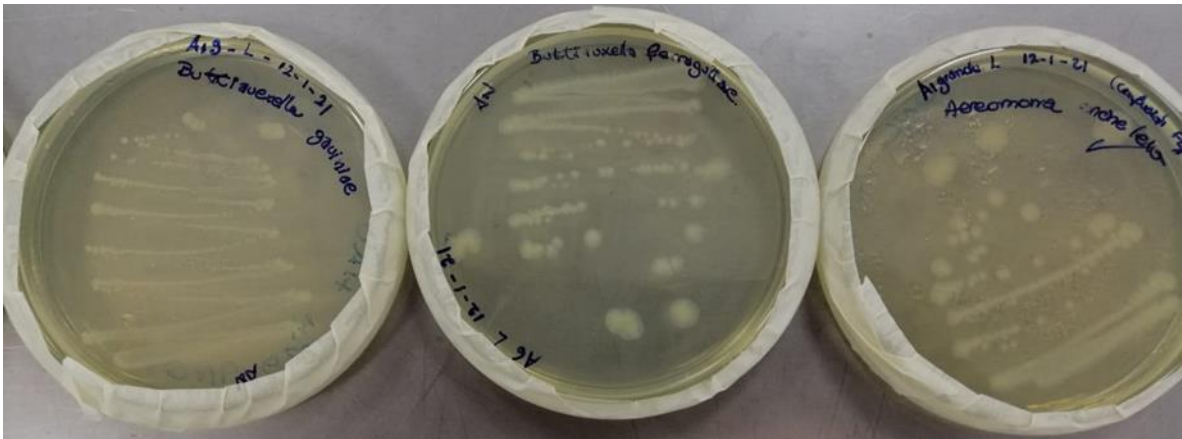
A	-	-	-															
B	-	-	-	-	-	-	-	-										
C	-	-																
D	-	+																
E	-	+																
F	-	+																
G	-	+		+	+	+	+	+	+	+	-	+						
H	-	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Descripción: Siembra en placa petri y anotación de resultados de placa de microdilución.

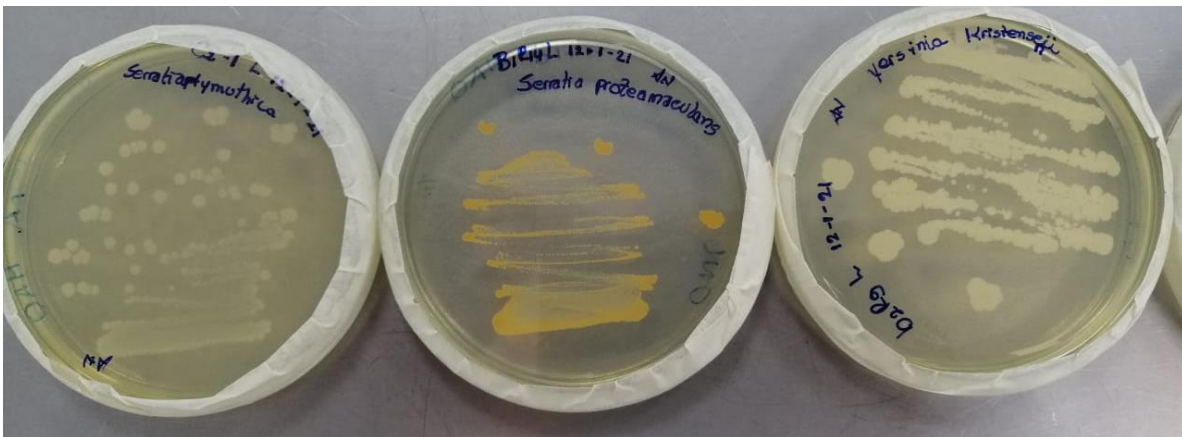
Anexo 3: Reactivación de cepas



Descripción: Cepas reactivadas (*Bacillus pumillus*-b3R; *Paenibacillus stellifer* -C2(2); *Yersinia enterocolitica*-G23)



Descripción: Cepas reactivadas (*Buttiauxella gaviniae*-A19; *Buttiauxella ferruguliae*-A6; *Aeromonas encheleia*-A1)

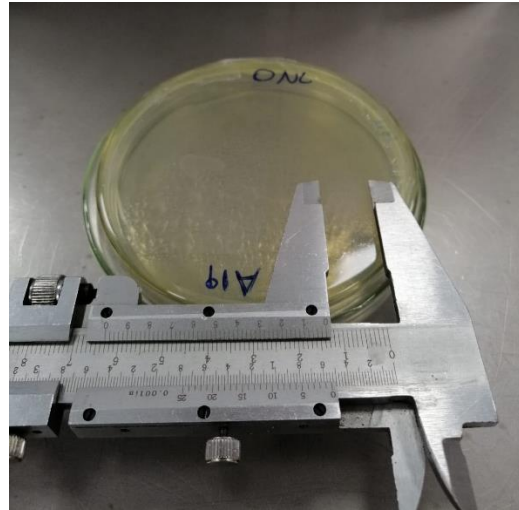
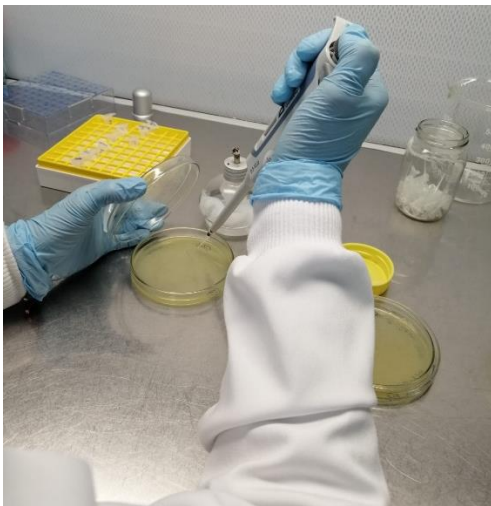


Descripción: Cepas reactivadas (*Serratia plymuthica*-C2-1; *Serratia plymuthica*-B1R14; *Yersinia kristensenii*-b2R9)



Descripción: Cepas reactivadas (*Mycobacterium sp*-f2; *Bacillus muralis*-b17R; *Aeromonas molluscorum*-b5R)

Anexo 4: Evaluación de potencial nitrificante



Descripción: Siembra con micropipeta en cajas petri dispensadas con los medios de cultivo respectivos, formación y medición del halo de acidificación.

Anexo 5: Tablas de lecturas de nitritos

CEPA	GENERO	NO2- MEDIO LIQUIDO SINTÉTICO (mg/l)	Muestra 1					Muestra 2						
			NO ₂ . (mg/l) RESIDUAL	NO ₂ . (mg/l) REDUCCIÓN	PORCENTAJE DE DISMINUCIÓN DE NO ₂ .			NO ₂ . (mg/l) RESIDUAL	NO ₂ . (mg/l) REDUCCIÓN	PORCENTAJE DE DISMINUCIÓN DE NO ₂ .				
b3R	<i>Bacillus pumilus</i>	376	0	0	376	376	100.00	26.60	0	0	376	376	100.00	100.00
b2R9	<i>Yersenia kristensenii</i>	376	0	0	376	376	100.00	26.60	11	3	365	373	97.07	99.20
G23	<i>Yersenia enterocolitica</i>	376	168	454	208	-78	-20.74	-5.52	111	196	265	180	70.48	47.87
A1	<i>Aeromonas encheleia</i>	376	22	170	354	206	54.79	14.57	190	19	186	357	49.47	94.95
b5R	<i>Aeromonas molluscorum</i>	376	254	357	122	19	5.05	1.34	351	339	25	37	6.65	9.84
C2-1	<i>Serratia plymuthica</i>	376	0	0	376	376	100.00	26.60	0	0	376	376	100.00	100.00
A19	<i>Buttiavexella gaviniae</i>	376	225	105	151	271	72.07	19.17	232	77	144	299	38.30	79.52
b17R	<i>Bacillus muralis</i>	376	0	329	376	-47	-12.50	-3.32	0	41	376	335	100.00	89.10
A6	<i>Buttiavexella ferraguliae</i>	376	202	229	174	147	39.10	10.40	572	183	-196	193	-52.13	51.33
f2	<i>Mycobacterium sp</i>	376	284	312	92	64	17.02	4.53	339	328	37	48	9.84	12.77

Descripción: Detalle de medición de nitritos para la muestra y su réplica. Así como la disminución de nitritos en mg/l y en porcentaje, días de muestreo 15 y 20.

Muestra 3						Muestra 4						Muestra 5					
NO ₂ . (mg/l) RESIDUAL	NO ₂ . (mg/l) REDUCCIÓN	PORCENTAJE DE DISMINUCIÓN DE NO ₂ .				NO ₂ . (mg/l) RESIDUAL	NO ₂ . (mg/l) REDUCCIÓN	PORCENTAJE DE DISMINUCIÓN DE NO ₂ .				NO ₂ . (mg/l) RESIDUAL	NO ₂ . (mg/l) REDUCCIÓN	PORCENTAJE DE DISMINUCIÓN DE NO ₂ .			
3	0	373	376	99.20	100.00	3	1	373	375	99.20	99.73	0	9	376	367	100.00	97.61
8	4	368	372	97.87	98.94	12	3	364	373	96.81	99.20	7	5	376	367	100.00	97.61
69	65	307	311	81.65	82.71	94	47	282	329	75.00	87.50	45	57	369	371	98.14	98.67
148	4	228	372	60.64	98.94	118	3	258	373	68.62	99.20	186	6	190	370	50.53	98.40
337	108	39	268	10.37	71.28	248	98	128	278	34.04	73.94	270	71	106	305	28.19	81.12
0	0	376	376	100.00	100.00	0	0	376	376	100.00	100.00	1	2	375	374	99.73	99.47
32	99	344	277	91.49	73.67	42	54	334	322	88.83	85.64	73	73	303	303	80.59	80.59
0	1	376	375	100.00	99.73	1	1	375	375	99.73	99.73	0	0	376	376	100.00	100.00
88	203	288	173	76.60	46.01	83	192	293	184	77.93	48.94	194	177	182	199	48.40	52.93
87	48	289	328	76.86	87.23	198	153	178	223	47.34	59.31	81	66	295	310	78.46	82.45

Descripción: Detalle de medición de nitritos para la muestra y su réplica. Así como la disminución de nitritos en mg/l y en porcentaje, días de muestreo 25, 30 y 35.

Muestra 6						
NO ₂ - (mg/l) RESIDUAL		NO ₂ - (mg/l) REDUCCIÓN		PORCENTAJE DE DISMINUCIÓN DE NO ₂ -		
0	68	376	308	100.00	81.91	
14	0	376	308	100.00	81.91	
79	49	362	376	96.28	100.00	
45	20	331	356	88.03	94.68	
54	83	322	293	85.64	77.93	
0	0	376	376	100.00	100.00	
31	81	345	295	91.76	78.46	
0	1	376	375	100.00	99.73	
40	51	336	325	89.36	86.44	
33	33	343	343	91.22	91.22	

Descripción: Detalle de medición de nitritos para la muestra y su réplica. Así como la disminución de nitritos en mg/l y en porcentaje, día de muestreo 40.

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, **Steeven Alexander Pereira Samaniego** portador(a) de la cédula de ciudadanía N^o **0706373057**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Evaluación del potencial nitrificante de cepas bacterianas cultivables aisladas del suelo de un bosque nativo y bosque de pino ubicados en la microcuenca del Machángara”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **17 de enero de 2022**

F: 

Steeven Alexander Pereira Samaniego
C.I. **0706373057**