

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BACTERIANA  
NITRIFICANTE EN SOLUCIÓN ACUOSA Y SU  
RECONOCIMIENTO "IN SITU"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE :  
MAESTRA EN CIENCIAS (ECOLOGÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES )  
P R E S E N T A :  
BIOL. ROSARIO RODRIGUEZ RODRIGUEZ

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO**

MEXICO, D.F.

ENERO 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OFICIO FCIE/DEP/0116/03

ASUNTO: Asignación de Sinodales.

**DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO**  
PRESENTE.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) **BIÓL. ROSARIO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ**, quien desarrolló el trabajo de tesis titulado: **Estudio de la actividad bacteriana nitrificante en solución acuosa y su reconocimiento *in situ***.

Asimismo comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 10 de febrero del año en curso, ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS (ECOLOGÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES)**.

| CARGO      | GRADO      | NOMBRE COMPLETO                     |
|------------|------------|-------------------------------------|
| PRESIDENTE | : DR.      | VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO          |
| VOCAL      | : M. EN C. | VÍCTOR OLVERA VIASCÁN               |
| SECRETARIO | : M. EN C. | HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGÓMEZ |
| SUPLENTE   | : DR.      | GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ               |
| SUPLENTE   | : M. EN C. | ROSA MARÍA RAMÍREZ GAMA             |

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D. F., 24 de febrero del 2003  
**JEFE DE LA DIVISIÓN**

  
**DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS**

DCRV/ASR/

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rosario Rodríguez Rodríguez  
FECHA: 14-Ene-04  
FIRMA: Rosario Rodríguez

DEDICADA A:

MI FAMILIA

MIS PADRES CARMEN Y LUCAS.

MIS HERMANOS ANTONIO, RENÉ, RAÚL, GERARDO, ROSALBA Y  
VERÓNICA

¡¡MUCHAS GRACIAS POR AMARME INCONDICIONALMENTE!!

*AL INMENSO MAR DE LA VIDA QUE ME HA PERMITIDO LLEGAR A ESTE  
INSTANTE.*

## **RECONOCIMIENTOS**

Se agradece la beca proporcionada por el Proyecto FIES-IMP 96F-48-VI "Desarrollo de un proceso para facilitar la biodisponibilidad de compuestos recalcitrantes derivados del petróleo para su aplicación en sitios contaminados" para la realización de la presente tesis.

La realización de la fase experimental contó con el apoyo económico otorgado, a través del proyecto PAIP 5290-12 y PAIP 6190-14 por parte de la Facultad de Química de la UNAM.

A el Laboratorio 301 deL PIQAYQA y al Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, y al Laboratorio de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, por haber proporcionado los instrumentos y materiales empleados en la realización del trabajo experimental.

A el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por su apoyo y su paciencia, ¡¡MUCHAS GRACIAS!!

## ÍNDICE GENERAL

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>RESUMEN</b>  |      |
| <b>I INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1    |
| <b>II MARCO TEÓRICO</b> .....   | 2    |
| II.1.- LOS COMPUESTOS DEL NITRÓGENO COMO CONTAMINANTES ..                                     | 2    |
| II.2.- EL PROCESO DE NITRIFICACIÓN .....  | 2    |
| II.3.- FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DE NITRIFICACIÓN .....                                 | 3    |
| II.4 ASPECTOS TAXONÓMICOS DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES ..                                   | 6    |
| II.5 MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD NITRIFICANTE .....                                     | 9    |
| II.5.1 Métodos cuantitativos .....  | 9    |
| II.5.2 Métodos cualitativos .....   | 11   |
| II.5.3 Reconocimiento morfológico .....   | 14   |
| II.6 LEGISLACIÓN SOBRE LAS DESCARGAS DE AMONIACO, NITRITO Y<br>NITRATOS .....                 | 15   |
| <b>III OBJETIVOS</b> .....  | 17   |
| III.1 OBJETIVO GENERAL .....  | 17   |
| III.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....  | 17   |
| <b>IV MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 17   |
| <b>IV.1 PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL</b> .....  | 20   |
| IV.1.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS ENRIQUECIDOS DE BACTERIAS<br>NITRIFICANTES.....                  | 20   |
| IV.1.2 Enriquecimiento bacteriano primario.....   | 20   |
| IV.1.3 Enriquecimiento secundario o específico de bacterias nitrificantes<br>(cultivo D)..... | 21   |
| IV.1.4 Separación de bacterias nitritantes y nitratantes.....                                 | 21   |
| IV.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.....   | 22   |
| IV.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.....  | 23   |
| IV.3.1. Observaciones microscópicas.....  | 23   |
| IV.3.1.1 Obtención de los organismos de interés.....  | 23   |
| V.3.2. Ensayos fisiológicos.....  | 24   |
| IV.3.2.1 Detección de la actividad nitrificante con el reactivo de Griess.....                | 24   |
| IV.3.2.2 Pruebas de reacción biológica para nitrificantes (BART).....                         | 25   |
| IV.3.3 Ensayos respirométricos.....   | 25   |
| IV.3.4 Cuantificación de bacterias nitrificantes.....   | 26   |
| <b>IV.4 SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL</b> .....  | 26   |
| IV.4.1 SEGUIMIENTO DE LA NITRIFICACIÓN EN CONDICIONES<br>CONTROLADAS.....                     | 26   |

|   | <b>Pag.</b> |
|---|-------------|
| IV.4.2 APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE NITRIFICACIÓN EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA..... | 27          |
| <b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>28</b>   |
| <b>V.1 PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>28</b>   |
| V.1.1 Caracterización fisicoquímica de aguas residuales de origen doméstico.....  | 28          |
| V.1. 2 Obtención de cultivos enriquecidos de bacterias nitrificantes.....   | 28          |
| V.1.3 Separación de bacterias nitritantes y nitratantes.....  | 29          |
| V.1.4 Resultados de cambios físicos y químicos registrados en los cultivos enriquecidos.....                                      | 29          |
| V.1.5 Análisis microbiológicos.....   | 30          |
| V.1.5.1 Observaciones microscópicas.....  | 30          |
| V.1.5.2 Resultados de la actividad nitrificante.....  | 45          |
| V.1.5.3 Ensayos respirométricos.....  | 47          |
| V.1.5.3.1 Primera corrida experimental.....   | 47          |
| V.1.5.3.2 Segunda corrida experimental.....   | 48          |
| V.1.5.3.3 Tercera corrida experimental.....   | 49          |
| V.1.5.4 Cuantificación de bacterias nitrificantes.....  | 50          |
| V.1.5.5 RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AMONIO-NITRATO Y BACTERIAS NITRIFICANTES.....   | 51          |
| V. 1. 6 Conclusiones parciales.....   | 52          |
| <b>V.2 SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>53</b>   |
| V.2.1 SEGUIMIENTO DE LA NITRIFICACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS.....   | 53          |
| V.2.1.1 Comparación de la nitrificación en cultivos sin airear y cultivos aireados.....   | 53          |
| V.2.1.2 Cuantificación de agregados y unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias nitrificantes.....                       | 56          |
| V.2.3 APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE NITRIFICACIÓN EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA.....  | 57          |
| V.2. 4 Conclusiones parciales.....  | 58          |
| V 2.5 CONCLUSIONES GENERALES.....   | 59          |
| <b>VI LITERATURA CONSULTADA.....</b>  | <b>61</b>   |
| <b>VIII ANEXO .....</b>   | <b>66</b>   |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1.- Límites permisibles de descarga de amoniaco, nitritos y nitratos para diferentes tipo de agua .....  | 15   |
| Tabla 2.- Características de las bacterias nitrificantes consideradas para el presente estudio de acuerdo con Sharma y Ahlert (1977), Holt (1999) y los obtenidos en el presente estudio ..... | 27   |
| Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales conducidas por el Río Magdalena.....  | 28   |
| Tabla 4.- Registro de los parámetros fisicoquímicos del inóculo ARD .....  | 30   |
| Tabla 5.- Registro de los parámetros fisicoquímicos del inóculo ARDESA .....   | 30   |
| Tabla 6a. Características de las bacterias nitrificantes consideradas para el presente estudio de acuerdo con Sharma y Ahlert (1977), Holt (1999).....   | 44   |
| Tabla 6b. Características de las bacterias nitrificantes observadas en el presente estudio.....  | 45   |
| Tabla 7.- Valores obtenidos de la concentración de amoniaco y nitrato durante el lapso de 96 horas, empleando 100mg/L de cloruro de amonio ...   | 48   |
| Tabla 8.- Concentración de amoniaco removido y transformado a nitrato utilizado una concentración inicial de 100 mgNH <sub>3</sub> /L durante 96 horas .....                                   | 49   |
| Tabla 9. Valores promedio de amoniaco transformado a nitrato empleando una concentración inicial de 10 mg/L de cloruro de amonio.....  | 50   |
| Tabla 10. Número de bacterias nitrificantes encontradas a diferentes concentraciones empleando el respirómetro.....  | 50   |
| Tabla 11.- Resultados obtenidos de la actividad nitrificante en un cultivo cerrado sin aporte de aire .....  | 53   |
| Tabla 12.- Datos obtenidos de la transformación de amoniaco bajo oxigenación constante en un cultivo cerrado .....   | 54   |
| Tabla 13.- Cuantificación del número de bacterias encontradas en los cultivos cerrados o por lote .....  | 56   |
| Tabla 14.- Detección de actividad nitrificante en aguas residuales domésticas de la planta de tratamiento de C. U. ....  | 57   |

## INDICE DE FIGURAS

|   | Pág. |
|---|------|
| Figura 1.- Modelo de la oxidación del amoniaco a nitrito ( <i>AMO=enzima amoniooxigenasa; HAO=hidroxilamina</i> ) .....   | 11   |
| Figura 2.- Modelo del gradiente de electrones acoplado a la oxidación del nitrito por <b><i>Nitrobacter</i></b> (P = periplasma; M = membrana celular; C = citoplasma)..... | 13   |
| Figura 3a.- Diagrama de la metodología seguida en la primera etapa experimental.....  | 18   |
| Figura 3b.- Metodología empleada en la segunda etapa experimental .....   | 19   |
| Figura 4.- Elaboración de los inóculos para obtener bacterias nitrificantes ..  | 21   |
| Figura 5.- Aspecto de los agregados bacterianos nitrificantes obtenidos de los cultivos ARDESA, teñidos con azul de metileno (10 x) .....                                   | 32   |
| Figura 6.- Agregado bacterianos obtenidos del cultivo ARDESA, teñido con azul de metileno (20 x) .....  | 33   |
| Figura 7.- Agregados bacterianos de los cultivos NS observados con azul de metileno (100 x) .....   | 33   |
| Figura 8.- Agregados bacterianos teñidos (cultivo NS) en rojo empleando la técnica de Gram (40 x).....  | 34   |
| Figura 9.- <b><i>Nitrosomonas sp.</i></b> , obtenidas de cultivos selectivos y teñidas en rojo empleando la técnica de Gram (40 x).....                                     | 34   |
| Figura 10.- Agregados bacterianos nitrificantes obtenidos del cultivo NS teñidos con Neisser (40 x) .....   | 35   |
| Figura 11.- Agregados bacterianos nitrificantes del cultivo NS teñidos con Neisser (100 x) .....  | 35   |
| Figura 12.- Agregados bacterianos nitrificantes obtenidos del cultivo NB teñidos en azul con Neisser (40 x) .....   | 36   |
| Figura 13.- Agregados de <i>Nitrobacter</i> obtenidos del cultivo NB, teñidos en rojo empleando la tinción safranina 0 y Sudan IV (40 x) .....                              | 37   |
| Figura 14.- Agregado de <b><i>Nitrobacter</i></b> obtenido del cultivo NB teñido en rojo empleando safranina 0 y con Sudan IV (100x) .....                                  | 37   |

|  |    |
|--|----|
| Figura 15.- Agregados bacterianos observados durante los ensayos respirométricos observados con iluminación de contraste de fases (40 x) ....  | 38 |
| Figura 16.- <i>Nitrosomonas sp.</i> observadas con la técnica de microscopía electrónica de transmisión .....  | 39 |
| Figura 17.- Imagen ampliada de <i>Nitrosomonas sp.</i> conformando agregados. Fotomicrografía tomada empleando microscopio electrónico de transmisión .....  | 40 |
| Figura 18.- Proceso de división de <i>Nitrosomonas sp.</i> , imagen observada al microscopio electrónico de transmisión .....  | 41 |
| Figura 19.- Agregados de <i>Nitrobacter sp.</i> , mostrando inclusiones de PHB, extraídos de un cultivo sometido a condiciones anaerobias en presencia de acetato de sodio. Imagen observada al microscopio electrónico de transmisión ..... | 42 |
| Figura 20.- Agregados de <i>Nitrobacter sp.</i> , mostrando inclusiones de PHB Observación realizada al microscopio electrónico de transmisión .....   | 43 |
| Figura 21.- Perfil de transformación de amoníaco a nitrato a lo largo del tiempo .....   | 51 |
| Figura 22.- Velocidad de nitrificación en cultivo cerrado sin suministro de aire .....   | 54 |
| Figura 23.- Velocidad de nitrificación con suministro de aire constante .....  | 55 |

## **AGRADECIMIENTOS**

Al la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, en particular a la colaboración de Jorge Sepúlveda quien presto apoyo en la obtención de las micrografías del presente estudio.

A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama, por las sugerencias aportadas en el presente trabajo.

Al Tec. Electrónico Raúl Rodríguez Rodríguez, por su colaboración en la elaboración de esquemas y figuras. ¡¡MUCHAS GRACIAS HERMANO!!

A mis compañeros: El Ing Víctor Alvarez, al Biól Fidel Galván Armendáriz, al M. en C. Manuel Xicoténcatl López Andrade, a la M. en C. Miriam Piña Cobos, por su apoyo y amistad.

A la Biól. María del Rosario Calderon Ramírez, por sus eternos apoyo y amistad.

**¡¡¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!**

## RESUMEN

En el proceso de nitrificación intervienen comúnmente dos grupos bacterianos, los amonio-oxidantes y los nitrito-oxidantes. El objetivo del presente trabajo contempla, por un lado, la aplicación de técnicas rápidas y sencillas para la detección de la actividad nitrificante y, por otro, el reconocimiento morfológico directo de agregados con actividad nitrificante, ambos "in situ". La metodología implicó inicialmente la elaboración de medios de cultivo empleando agua residual de tipo doméstico enriquecida con sulfato de amonio (ARESA), así como de medios selectivos para el aislamiento e identificación de bacterias nitrificantes de las especies **Nitrosomonas europaea** (NS) y **Nitrobacter winogradsky** (NB). Posteriormente, se experimentó con un respirómetro Voith-Sapromat y cultivos en matraces cerrados, bajo condiciones controladas de temperatura, pH, agitación y aireación. Se midieron las concentraciones de  $\text{NH}_3$  y  $\text{NO}_3^-$ . Conjuntamente se utilizaron, para el reconocimiento de la actividad metabólica bacteriana bajo estudio, las pruebas de actividad biológica (BART) para nitrificación. Asimismo, se aplicó el reactivo de Griess, el cual reacciona de manera específica con los nitritos, permitiendo así su detección cuando se encuentran presentes en una determinada muestra. La presencia de nitritos se constata mediante la observación de un cambio en la coloración de la muestra de agua, la cual se torna rosa o púrpura, por lo cual puede emplearse para detectar la actividad bacteriana nitrificante "in situ". Para corroborar la existencia de bacterias nitrificantes, se elaboraron tinciones vitales y supravitales con azul de metileno, tinción de Neisser, Gram y empleando negro de Sudan. Esta última tinción permite distinguir entre bacterias de la especie **Nitrosomonas europaea** (nitritantes) y **Nitrobacter winogradsky** (nitratantes), con base en la capacidad o no de formar gránulos de polihidroxibutirato (PHB), que tienen únicamente esta última. En el estudio morfológico de las dos especies, también se recurrió al empleo de técnicas de microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos en la aplicación de las pruebas BART en el cultivo (ARDESA), medios enriquecidos, respirómetro y cultivos cerrados, fueron positivos indicando la presencia de bacterias nitrificantes. La generación del nitrito producto primario del proceso de nitrificación quedó evidenciada de manera instantánea al aplicar el Reactivo de Griess en los diferentes cultivos. En cuanto a la morfología de las bacterias nitrificantes, mediante las observaciones al microscopio, estas pudieron ser detectadas rápidamente en forma de agregados azules de tamaño variable, pudiendo ser teñidas con azul de metileno y Neisser, resultando en ambos casos Gram negativas. No obstante, pero al aplicar la tinción de Sudan, pudo observarse la presencia de gránulos de PHB en los agregados conformados por NB. Estas observaciones fueron corroboradas con los análisis de fotomicrografías tomadas mediante el microscopio electrónico de transmisión. La metodología fue aplicada en muestras de aguas residuales provenientes de la Planta de Tratamiento de Agua de Ciudad Universitaria (PTARCU), colectadas y analizadas "in situ", encontrándose y diferenciándose poblaciones de bacterias nitrificantes tanto del tipo NS y NB, en forma de agregados. Posteriormente, los análisis fisicoquímicos permitieron corroborar que estas tenían actividad nitrificante y que participaban en el proceso depurador de la PTARCU. Con base en éstos resultados, puede decirse que, la aplicación "in situ" de las diferentes técnicas de tinción practicadas, permiten reconocer de manera rápida si hay o no presencia y actividad de bacterias nitrificantes en un determinado volumen de agua.

## I INTRODUCCIÓN

La actividad de la vida en la tierra esta estrechamente asociada con el elemento nitrógeno, el cual existe en varios estados de oxidación que van de -3 a +5, siendo los más importantes -3 ( $\text{NH}_3$ ) amoníaco, +3( $\text{NO}_2$ ) nitrito y +5( $\text{NO}_3$ ) nitrato.

La presencia de amoníaco, nitritos y nitratos en aguas residuales en altas concentraciones se consideran como contaminantes. Estos compuestos en determinadas concentraciones resultan tóxicos para la vida acuática existente en un cuerpo o corriente de agua natural.

En particular, la presencia de estos compuestos en aguas residuales, en su forma de iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) son altamente tóxicos para los peces. De igual forma lo son el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). La oxidación del amonio a nitrato, requiere de consumo de oxígeno disuelto (OD), lo que trae como consecuencia el abatimiento en la concentración de este elemento en un determinado volumen de agua. Adicionalmente, estos compuestos de nitrógeno, pueden constituir un factor determinante para acelerar el fenómeno de eutroficación en lagos, lagunas y embalses (naturales y artificiales), conllevando al deterioro fisicoquímico y biológico de los mismos. De aquí la importancia de eliminar dichos compuestos de las aguas residuales, antes de que sean descargados en cuerpos acuáticos receptores (Sedlack, 1991; Çelik *et al.*, 2001).

Para industrias como la pesquera, camaronícola y otras cuyo desarrollo implica el uso *per se* de cuerpos y corrientes de agua, así como el incremento en el contenido de amonio excretado por los organismos cultivados, la eliminación de ese tipo de contaminantes puede realizarse por sistemas de tratamiento biológico.

Una primera fase, tendiente a la eliminación de amonio en agua, es su oxidación a nitratos. Por lo anterior, el presente trabajo se enfocó hacia aspectos relacionados con el fenómeno de nitrificación, los cuales incluyen el uso de colorantes que permitan la rápida detección de la presencia o no de reacción nitrificante, así como de métodos de cuantificación de bacterias nitrificantes.

A continuación se presentarán los principales aspectos teóricos relacionados con la contaminación de compuestos nitrogenados, el proceso de nitrificación biológica y las condiciones fisicoquímicas que lo afectan.

## II MARCO TEÓRICO

### II.1 LOS COMPUESTOS DEL NITRÓGENO COMO CONTAMINANTES

Si bien los compuestos nitrogenados son importantes para el correcto desarrollo de la vida en cuerpos de agua natural, un exceso de los mismos ocasiona un desequilibrio del ecosistema, lo que a su vez se traduce en contaminación del cuerpo de agua receptor.

Desde el punto de vista de contaminación ambiental, los compuestos nitrogenados se encuentran clasificados entre los principales contaminantes del agua, presentándose preferentemente en aguas residuales de la industria alimentaria, agrícola y de tipo doméstico. Los compuestos que se consideran como principales contaminantes son el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Para su eliminación de las aguas residuales puede recurrirse a los procesos biológicos de nitrificación y des-nitrificación. La eliminación vía biológica de dichos compuestos, es un método económico y que no genera residuos que requieran un manejo especial, lo cual si ocurre cuando se emplean métodos fisicoquímicos.

La acumulación de compuestos nitrogenados se presenta en el suelo como consecuencia de la descarga de aguas residuales y la adición inadecuada de fertilizantes. De no ocurrir la transformación de amonio a nitrato, las plantas no se desarrollan óptimamente debido a que el primero, como sal de amonio, es tóxico a altas concentraciones y de difícil asimilación, mientras que el segundo (el nitrato), es un nutrimento esencial para las plantas, por lo que es deseable que este presente en el medio.

En el caso de los ambientes acuáticos, el nitrato es también un nutrimento esencial para el desarrollo de vegetación acuática, en consecuencia, un aumento en su concentración lo convierte en un factor promotor de la productividad primaria, lo cual puede ocasionar la eutroficación del ambiente acuático (Çelik *et al.*, 2001)

### II.2 EL PROCESO DE NITRIFICACIÓN

En el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (N), la nitrificación es una de las fases en la transformación del N de su forma orgánica a la mineral. El término "nitrificación" es aplicado a la oxidación biológica del amonio en dos pasos, primero a la forma de nitrito y segundo, de nitrito a nitrato. Los microorganismos involucrados en estas reacciones se conocen como oxidadores de amonio o nitritantes y oxidadores de nitrito o nitratantes. Entre los microorganismos que intervienen en la transformación, se encuentran bacterias heterótrofas y autótrofas, hongos y algunas algas (Oremland y Capone, 1988; De-A-Cybys y Horan, 1997; Hommes *et al.*, 1998; Hurts *et al.*, 1997; Schramm *et al.*, 1999).

Se ha estimado que la concentración de nitrógeno en aguas urbanas y municipales crudas contiene de 20 a 80 mg/L. La nitrificación puede ser descrita de acuerdo

con la siguiente ecuación (Eckenfelder y Argaman, 1991; Cardot, 1999; Klotar *et al.*, 1996; Vayenas *et al.*, 1997; Seyfried *et al.*, 2001):



Las **Nitrosomonas** son bacterias oxidadoras de amonio obligadas, en consecuencia el aumento o baja concentración de amonio, además de una exposición prolongada al incremento del nitrito, producto primario de su metabolismo, inhibe la actividad enzimática nitritante. Adicionalmente, se ha estimado que por cada mol de amonio transformado se genera una mol de nitrito (Steind y Arp, 2001).

El segundo paso en la oxidación de amonio, implica la transformación de nitritos a nitratos, lo cual es realizado por medio de **Nitrobacterias**, de acuerdo con la siguiente reacción:



En aguas urbanas, empleando cultivos mixtos, se ha estimado que para oxidar 1 mg  $\text{NH}_4^+$ /L se requiere aproximadamente 4.6 mg/L de oxígeno (Meltca y Eddy, 1990; Prosser, 1992; Le-Bihan, 1995), en tanto que para 1mg/L de nitrito la Nitrobacterias necesitan 1.14 mg/L de oxígeno (Gray, 1989). En consecuencia puede decirse que de manera total, para la oxidación de 1mg de amonio a nitrato, se requieren de aproximadamente 5.74 mg/L de oxígeno.

### II.3 FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DE NITRIFICACIÓN

La nitrificación en la naturaleza y en sistemas de tratamiento se ve afectada por factores fisicoquímicos y biológicos, tales como:

**a) Microorganismos heterótrofos.**- La concentración de materia orgánica disuelta (MOD) en aguas residuales permite la proliferación de microorganismos heterótrofos que compiten con los oxidadores de amonio, principalmente por el recurso. Los microorganismos heterótrofos tienen la capacidad de emplear compuestos orgánicos del carbono y nitrógeno como fuente de alimento y energía necesarios para cubrir sus requerimientos metabólicos, por lo cual se ve agotada la disponibilidad del sustrato, en especial de amonio. Esta situación representa una desventaja para las bacterias quimioautótrofas oxidadoras de amonio como son las bacterias nitrificantes. Además las interacciones presa-predador, son otro factor que actúa sobre las poblaciones de bacterias nitrificantes presentes en el medio. (Hanaki, *et al* 1990; Le-Bihan, 1995; Holben *et al.*, 1998; Burrell *et al.*, 1998; Schramm *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999; Persson, 2002)

**b) Compuestos orgánicos e inorgánicos.**- Además de favorecer el crecimiento de microorganismos heterótrofos, la MOD en concentraciones superiores de 1,000

mgDQO/L, inhibe el crecimiento de los microorganismos nitrificantes. Lo anterior se debe a que tiene lugar un déficit de oxígeno disuelto situación que resulta desfavorable para dichas bacterias. En este sentido, se ha observado que en sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas, cuando existe una relación de nitrógeno:carbono de 5:1, resulta una condición favorable para que tenga lugar el proceso de nitrificación (Surmacz-Gorska *et al.*, 1996).

Compuestos como la glucosa, peptoglucanos, anilinas, antibióticos, metales pesados, vitaminas entre otros, son también inhibidores. También los compuestos clorados son análogos al nitrito, y aparentemente, compiten con el nitrato en el transporte de electrones a través de la membrana celular. Lo anterior trae como consecuencia que la liberación del nitrato no ocurra, propiciado la acumulación de ese compuesto dentro de la célula, ocasionando así efectos tóxicos en la bacteria. La metilamina es otro compuesto que actúa de manera similar a los compuestos clorados, teniendo como efecto inhibir la liberación de amonio (Oremland y Capone, 1988). Asimismo, se ha observado que en cultivos enriquecidos con tiourea, en concentraciones de 0.003 M, puede ocurrir una completa inhibición de la nitrificación después de 16 días debido a la falta de sustrato (Surmacz-Gorska *et al.*, 1996).

Por otra parte, el sodio es un elemento que promueve el crecimiento de las **Nitrosomonas** cuando se encuentra en  $10^{-2}$  M, mientras que el molibdeno en  $10^{-9}$  M favorece a las nitrobacterias.

Cualitativamente y cuantitativamente, se ha planteado que los organismos heterótrofos tales como actinomicetos, hongos y bacterias, a partir de nitrógeno orgánico, producen metabólicamente nitritos y nitratos que pueden ser tóxicos para las bacterias nitrificantes (Hanaki, 1990; Randall *et al.*, 1992; Drtil *et al.*, 1993; Sedlack, 1991; Okabe *et al.*, 1999; Persson *et al.*, 2002).

**c) Sustratos y productos de la nitrificación.**- La acumulación de amonio libre en una concentración aproximada de 10 a 150 mg como N-NH<sub>3</sub>/L a pH = 7.8 unidades, limita el crecimiento de las **Nitrosomonas**, mientras que para las nitrobacterias valores entre 0.1 y 1 mg N-NH<sub>3</sub>/L, resultan limitantes. El ácido nitroso, producto de la oxidación de amonio a nitrito, inhibe el crecimiento de las nitrobacterias cuando se encuentra en concentraciones de 1.68 mg/L a pH entre 7.2 y 5.8 unidades (Anthonisen *et al.*, 1976; Stanley *et al.*, 1981; Randall *et al.*, 1992).

Los hidrocarburos, halógenos y terpenos en forma natural, son sustratos alternos para las **Nitrosomonas**, por lo cual la transformación de amonio puede verse afectada, sin que ello implique inactividad por parte de éstas bacterias (Montuelle *et al.*, 1996; Hommes *et al.*, 1998).

**d) Luz.**- Referente a este parámetro, no se ha llegado a un acuerdo general. Se ha observado en cultivos de laboratorio que las bacterias nitrificantes crecen rápidamente cuando el medio de cultivo se mantiene en la oscuridad a una temperatura de 25°C (Sharma y Ahlert, 1977). Complementariamente, se ha

demostrado que las *Nitrosomonas* y las *Nitrobacterias* presentan inhibición metabólica entre 250 y 350 lux.

**e) Oxígeno disuelto (OD).**- La concentración de oxígeno disuelto es uno de los factores determinantes en el proceso de nitrificación, ello debido a que las bacterias nitrificantes son aerobias. Se ha reportado, como una concentración teórica óptima de 4.5 mg/L de oxígeno disuelto (OD) para oxidar 1 mg/L de nitrógeno en forma de amoníaco. No obstante, se sabe que aún en concentraciones de 0.3 a 1.0 mgOD/L, la nitrificación ocurre aunque en baja proporción (Metcalf y Eddy, 1990; Prosser, 1992). Normalmente, a esas bajas concentraciones de OD, se presenta una acumulación de nitrito, la cual tiende a desaparecer cuando el OD supera la concentración de 2.8 mg/L (Münch *et al.*, 1996; Montuelle *et al.*, 1996).

**f) El potencial de hidrógeno (pH)** - La nitrificación ocurre óptimamente en medios con un pH ligeramente alcalino. Para cultivos puros se estima que un valor entre 8.0 a 8.6 unidades es óptimo para nitrosomonas, mientras que un pH entre 7.3 a 8.4 unidades es el adecuado para nitrobacterias (Münch *et al.*, 1996; Gernaey *et al.*, 1998; Yang y Alleman, 1998; Yoo *et al.*, 1999).

En sistemas de tratamiento y cultivos mixtos, se han encontrado microorganismos nitrificantes en medios ácidos, 4.0 unidades de pH, sin embargo la actividad nitrificante de las bacterias se ve inhibida (Hanaki *et al.*, 1990a; Bortone *et al.*, 1994). También, se ha observado que en cultivos puros, un descenso en el pH es indicativo de que el proceso de nitrificación se está llevado a cabo (Stanley *et al.*, 1981; Villaverde *et al.*, 1997).

En cultivos de flujo cerrado, empleando *Nitrosomonas europaea*, se ha detectado que el nitrito acumulado en una concentración de 20 mM y a un pH = 6, no resulta ser altamente inhibitorio de la actividad transformadora de este tipo de bacterias (Stein y Arp, 1998).

Por otra parte, se ha observado tanto en el suelo, ambientes acuático y medios de cultivo semisólidos, donde el equilibrio catiónico es influenciado por las cinéticas de las reacciones de transformación bacteriana, a un pH = 7.5 a 8.0 unidades, la actividad nitrificante es inhibida (Hommes *et al.*, 1998).

En suma, se ha comprobado que un pH ácido inhibe la actividad nitrificante, mientras que el medio alcalino es una condición óptima para el desarrollo de este tipo de bacterias. Sin embargo, aún en medios alcalinos, las interacciones son complejas de estudiar, por lo que el cambio de pH es desde el punto de vista práctico, útil como indicador de actividad nitrificante.

**g) Temperatura.**- Las bacterias nitrificantes son microorganismos mesófilos y se desarrollan óptimamente, en intervalos de temperatura entre 25 y 36°C. No obstante, se han registrado valores que indican que aún a 20°C, la tasa de

nitrificación de sistemas de tratamiento de aguas residuales es aceptable (Bortone *et al.*, 1994; Stein y Arp, 1998; Strous *et al.*, 1999).

**h) Tiempo de retención celular (TRC).** - La permanencia de los organismos nitrificantes en un sistema de tratamiento es determinante para la transformación de amonio a nitrato. Se ha sugerido que cuando los oxidadores de estos compuestos se encuentran poco abundantes, el TRC debe ser mayor al que previamente se ha establecido. Otro de los factores que se encuentran asociados con el TRC, es la temperatura, si esta es baja también se deberá considerar un incremento en el TRC. En los sistemas de lodos activados se estima como un TRC adecuado de 3 a 4 días siempre y cuando se mantengan dentro de los intervalos óptimos los factores fisicoquímicos, tales como, pH, temperatura, oxígeno disuelto y concentración de compuestos orgánicos. En condiciones reales, para sistemas de tratamiento como filtros percoladores, se maneja un intervalo de 20 a 30 días como TRC óptimo (Vayenas *et al.*, 1997).

#### II.4 ASPECTOS TAXONÓMICOS DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

Las bacterias nitrificantes se encuentran ubicadas taxonómicamente dentro de la Familia Nitrobactereaceae, la cual se compone por dos grupos fisiológicos, amonio-oxidantes y nitritoxidantes, que no tienen ninguna relación filogenética.

Entre los estudios relativos a su caracterización destacan los trabajos realizados por Sergei y Helene Winogradsky 1892, pioneros en estudios de ecología microbiana. De acuerdo con sus estudios morfológicos es posible reconocer 14 especies, repartidas en los dos grupos, siendo el género tipo ***Nitrobacter***, *Winogradsky* que le da el nombre a la familia (Holt, 1999).

En revisiones posteriores de la evolución y diversidad natural de las bacterias nitrificantes, se ha recurrido al empleo de las técnicas de serotipos para determinar su relación entre especies del mismo grupo (Kowalchuck y Stephen, 2001; Prioult *et al.*, 2002). Asimismo, también se ha hecho uso de las herramientas de tipo genético basándose principalmente en la secuencia genética de los ácidos nucleicos; ácido desoxi-ribonucleico y ácido ribonucleico ribosomal, así como en el reconocimiento proteico de enzimas específicas, tales como la amonio-mono-oxigenasa. En estos trabajos se colocan a las bacterias nitrificantes en dos subclases del grupo de las Protobacterias (Olsen y Woese, 1993; Prescott *et al.*, 1999; Purkhold *et al.*, 2000; Geiseke *et al.*, 2001; Persson *et al.*, 2002; Prioult *et al.*, 2002), siendo ***Nitrosomonas europaea*** una especie asignada al grupo beta ( $\beta$ ), mientras que ***Nitrobacter winogradsky*** al grupo alfa ( $\alpha$ ).

Cabe destacar que, no obstante a las nuevas clasificaciones, el aspecto fisiológico de estas bacterias siguen siendo el criterio más relevante para ubicarlas en uno u otro grupo, por lo que en el presente estudio se optó por emplear la clasificación propuesta por sus descubridores Sergei y Helene Winogradsky.

En este sentido, las bacterias nitrificantes han sido clasificadas de la siguiente manera (Holt, 1999).

**Familia Nitrobactereaceae Buchanan, 1917**

**Grupo: Bacterias amonio-oxidantes**

**Género (tipo): *Nitrosomonas***

**Grupo: Bacterias nitrito-oxidantes**

**Género (tipo): *Nitrobacter***

Como características diagnósticas de la Familia se mencionan las siguientes:

I) Es una familia diversa integrada por células en forma de bacilos o bastones, vibrios, cocos y espirilos. Las células en forma de cilindros cónicos o en forma de pera, son alargadas, elipsoidales, esféricas, espirales o lobulares sin endoesporas (Margullis y Schuartz, 1981; Holt, 1999).

II) En cultivos puros, enriquecidos y en la naturaleza, se pueden encontrar formando agregados rodeados por una membrana gelatinosa (Stanley *et al.*, 1981).

III) Sus células pueden o no ser móviles, con flagelos polares a laterales o peritricos.

IV) Utilizan amonio o nitrito como fuentes de energía, son capaces de crecer sin compuestos orgánicos, algunos utilizan el CO<sub>2</sub> como fuente de carbón y obtienen energía de la oxidación de amonio, nitrito, hidrocarburos, sulfuros y/o tiosulfatos (Stantey *et al.*, 1981).

V) Son quimioautótrofas y pueden crecer en medio mixotróficos (con excepciones como *Nitrobacter*) (Holt, 1999).

VI) Son bacterias de tipo aerobio capaces de vivir en medios con baja concentración de oxígeno (0.8 mg/L).

VII) En su mayoría reaccionan de manera negativa a la tinción de Gram (Holt, 1999).

VIII) Pueden presentar membranas intracitoplasmáticas aplanadas laminares o redondeadas a manera de tubos.

IX) Las bacterias pertenecientes a esta familia, se encuentran en ambientes aerobios donde la materia orgánica es mineralizada. Se distribuyen ampliamente en suelo, aguas dulces, marinas, salobres y residuales, así como en lodos biológicos residuales (Stanley *et al.*, 1981; Brock y Schlegel, 1989).

X) El ADN presenta de 45 a 62 mol% guanina+citosina (G+C).

Dentro de los géneros de esta familia, que con más frecuencia se han descrito y estudiado en aguas residuales, se encuentran las nitrosomonas y las

nitrobacterias. Dada la importancia de las mismas, a continuación se proporcionará mayor información, considerando como especies tipo dentro del presente estudio a ***Nitrosomona europaea*** y ***Nitrobacter winogradsky***. Lo anterior no implica la exclusión de otras especies de bacterias nitrificantes tales como ***Nitrospira*** sp. y ***Nitrosococcus*** sp., que pudieran desempeñar un papel importante dentro del fenómeno (Stanley *et al.*, 1981; Holt, 1999; Prescott *et al.*, 1999).

**A) *Nitrosomonas* Winogradsky (1892).**- generalmente este tipo de bacterias se observan libres en forma de bastón cilíndrico alargado, o bien en pares y en agregados elipsoidales rodeados por una membrana gelatinosa. Pueden presentar un flagelo polar sencillo, o un par cuando son móviles. La ultraestructura de las especies encontradas en suelo y sistemas de tratamientos, presentan subcapas adicionales a la membrana celular, denominadas citomembranas periféricas lamelares. En el citoplasma se localizan carboxisomas y gránulos de polifosfatos. Los estudios del ADN indican una composición de 47.4 a 51 mol % de G+C. Su reproducción es por fisión binaria. Como particularidad tiene la capacidad de oxidar amonio a nitrito más rápido que cualquier otro género de esta familia. Su distribución es amplia en suelo y sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales (Holt, 1999).

***Nitrosomona europaea*.**- morfológicamente este tipo de bacterias, son elípticas o bacilares de 0.9 a 1.0x1.8 micras, con sus bordes redondeados, en pares o formando cadenas cortas de 3 a 4 individuos, tienen un solo flagelo polar de 3 a 4 veces más largo que la célula. Crece rápidamente en medios preferentemente acuosos con o sin materia orgánica, o bien, enriquecidos con sulfatos de amonio, potasio y magnesio. En cultivo, las células se pueden acumular en masas móviles "agregados" alrededor de las partículas de carbonato de potasio en el fondo del frasco donde se cultivan; el medio líquido es ocasionalmente turbio debido a la presencia de los agregados. Aunque su cultivo en medios sólidos es difícil, no obstante, cuando se emplea sílica gel, se desarrollan colonias compactas con una coloración parda. Son bacterias estrictamente aerobias y quimioautótrofas, transforman el amoniaco a nitrito (Holt, 1999; Stein y Arp, 1998; Okabe *et al.*, 1999).

**B) *Nitrobacterias* Winogradsky (1892).**- Este tipo de bacterias tienen forma de pera o cono, sus dimensiones son de 0.6 a 0.8 x 1.0 a 1.2 micras, con una membrana gelatinosa rodeándola, no son móviles. Su ultraestructura muestra una citomembrana periférica en la región polar presentes en forma de cápsula a manera de vesículas aplanadas pudiendo ser en pares de 4 a 6. Las composición del ADN es de 60 a 61 mol% de G+C. Su reproducción es por gemación. Pueden ser cultivadas en medios libres de materia orgánica. Son sensibles a los compuestos como sales de amonio, su temperatura óptima de crecimiento es entre 25 a 28°C. Después de un periodo de cultivo de 7 a 10 días se pueden observar colonias circulares o irregulares de color pardo a claro a oscuro (Holt, 1999; Stanley *et al.*, 1981).

***Nitrobacter winogradsky***.- Son bacterias cilíndricas de 0.8 a 0.9x0.5 micras, algunas veces en pares o largos agregados, móviles con un flagelo polar de 7 a 10 veces más largo que el cuerpo. Pueden crecer en agar enriquecido con nitrito, observándose después de 2 semanas colonias semiesféricas, transparentes, en este tipo de medio se ha estimado la oxidación de nitrito completa después de 10-14 días, a una temperatura de 25 a 30°C, pH de 7.6 a 8.6 unidades (Okabe *et al.*, 1999). Este tipo de bacterias tienen la capacidad de oxidar el nitrito a nitrato. A diferencia de las ***Nitrosomonas***, es catalogada como autótrofa facultativa (Stanley *et al.*, 1981; Holt, 1999).

## II.5 MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD NITRIFICANTE

Teniendo el antecedente sobre el proceso de nitrificación, los microorganismos que intervienen y la problemática que representan el amonio, nitrito y nitrato en medios acuosos, se plantea como siguiente punto abordar los procedimientos que permitan reconocer la actividad nitrificante, así como la cuantificación de bacterias nitrificantes.

### II.5.1 Métodos cuantitativos

**A)** La medición de parámetros fisicoquímicos como la concentración de amonio, nitrito y nitrato, por diversas técnicas de laboratorio, tales como: la técnica de Nessler, por titulometría, y por medio de electrodos, entre otros, son empleados para estimar la cantidad de sustrato (amonio) transformado al producto (nitrito y nitrato). La aplicación de una u otra técnica se encuentra sujeta a las condiciones fisicoquímicas del agua en análisis, así como de la infraestructura con que se disponga (APHA, 1998).

Por otra parte, en la determinación de la velocidad nitrificante, que tiene como objetivo establecer la constante media de saturación ( $K_s$ ) y constante de sustrato removido ( $r_x$ ), destacan los métodos respirométricos, los cuales son los más simples y frecuentemente empleados. Estos procedimientos se basan en el consumo de oxígeno expresado en mg/L. La valoración se hace midiendo la cantidad de sustrato transformado por un número específico de bacterias nitrificantes, en un tiempo determinado (Drtil *et al.*, 1993; Surmarcz-Gorska *et al.*, 1996, Münch *et al.*, 1996).

**B)** La cuantificación de las bacterias nitrificantes, se realiza ya sea por grupo fisiológico, como es el número más probable para bacterias nitrificantes (Schinner *et al.*, 1995), o bien, de manera directa vía la cuenta en placa (Schade y Lemmer, 1994), así como por técnicas de microscopía de epifluorescencia (Holt, 1999).

Para obtener datos que permitan relacionar la abundancia de agregados bacterianos con la concentración de amoníaco y nitrato, se hace una estimación numérica de estas por medio de una cuenta directa y cuenta indirecta.

La cuenta directa se lleva a cabo, mediante la aplicación de la gota de Lackey (APHA, 1998) modificada, con el microscopio de contraste de fases acoplado 40 y 100 X a un sistema de video, que permite observar los agregados nitrificantes. Al igual que para los parámetros fisicoquímicos se toman muestras de 2 a 3 veces por semana.

Para la cuenta directa de agregados nitrificantes empleando la técnica de Lackey modificada (APHA, 1998), se requiere de un microscopio fotónico con capacidad para 1000 aumentos, portaobjetos, cubreobjetos, pipetas de 1mL graduadas y del colorante azul de metileno al 1% en solución acuosa. Esta técnica permite realizar un estimación directa, en un determinado volumen de muestra, enumerando a los agregados bacterianos de interés, invirtiendo para ello un lapso menor a los 5 minutos. Presenta como ventaja, el no necesitar la elaboración de un medio de cultivo selectivo, así como el destinar un determinado tiempo de incubación del cultivo, lo cual derivaría en un mayor costo y tiempo para obtener la respuesta buscada.

El principio de esta técnica se basa en la transferencia de una alícuota de muestra a una caja de Petri con un medio sólido que contenga los elementos nutricionales requeridos por las bacterias. Posteriormente, se incuba bajo condiciones ambientales óptimas, por un lapso de 3 a 10 días. La cuenta se realiza en base al desarrollo de colonias de bacterias formadas. El número de colonias contadas se considera como el número viable de microorganismos presentes en una determinada muestra (Schinner *et al.*, 1995). El material cual requiere de material de vidrio, tal como matraces, pipetas graduadas de 1mL, autoclave para la esterilización del material y medios de cial requerido es cajas Petri de vidrio o de plástico y los diversos reactivos que constituyen la formulación del medio (Holt, 1999), además de una incubadora. El tiempo necesario para poder observar los resultados esperados es de 7 a 10 días. Además del tiempo empleado, presenta como inconveniente el que no evidencia la totalidad de las bacterias activas presentes en la muestra en análisis, sino solo aquellas cuyas características culturales permitieron que se expresaran.

Otra técnica empleada para la cuenta indirecta de bacterias nitrificantes es la del número más probable (NMP). Este tipo de técnicas es la más frecuentemente empleada debido a los buenos resultados que aportan (Matulewich *et al.*, 1975 en Prosser, 1992; Schinner *et al.*, 1995). Es importante señalar que este es un método que se adecua para realizar la cuenta de un grupo fisiológico específico. La técnica del NMP, también conocida como de tubos de dilución, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo, lo que disminuye conforme el volumen de muestra inoculado es menor. Como parámetro fisicoquímico importante, se reporta que la incubación debe llevarse a cabo a una temperatura de 28°C, y la obtención de resultados requiere un período de cuatro semanas (Schinner *et al.*, 1995), lo que representa un período muy largo y poco práctico para la obtención de los resultados. Para la ejecución de ésta técnica se requiere el empleo de tubos de cultivo con rosca y campanas Durham. Debido a que es un método

probabilístico, requiere la elaboración de varias diluciones, lo cual dificulta su aplicación.

Considerando lo anterior, puede decirse que cada una de las técnicas señaladas presenta ventajas y desventajas, en cuanto a material disponible, y el conocimiento que de éstas debe tener el responsable de su aplicación, lo cual a su vez resulta determinante en la selección de la técnica a emplear.

## II.5.2 – Métodos cualitativos

A) Cualitativamente, puede destacarse la presencia de bacterias nitrificantes, mediante el empleo de reactivos específicos, tales como el reactivo de Nessler. En este sentido, después de ser aplicado a una determinada muestra de agua, si se observa una coloración parda, acompañada de un precipitado, será indicio de la presencia de amonio. Asimismo, una solución a base de ácido sulfanílico y sulfanilamida, aplicada a una muestra de agua bajo estudio, más polvo de zinc, dará como resultado la aparición de un tono rosa o púrpura indicando así la presencia de nitritos y, por lo tanto, la transformación de amonio a nitrato (Gerhardt *et al.*, 1994; Hommes *et al.*, 1998).

En el primer paso de la nitrificación, el amoniaco se transforma a nitrito por una serie de reacciones en la que intervienen principalmente las enzimas amoniooxigenasa (AMO) y la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO), esta última es la que participa en la formación final del nitrito. (Figura 1).

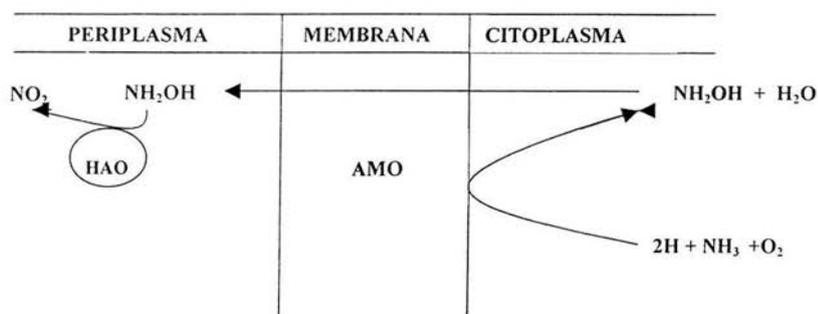
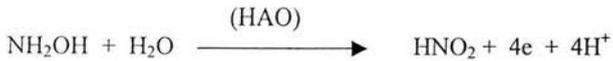
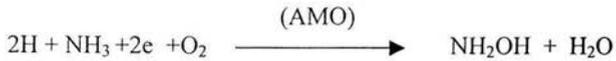


Figura 1.- Modelo de la oxidación del amoniaco a nitrito (AMO=enzima amoniooxigenasa; HAO=hidroxilamina)

A continuación se muestra de manera general el grupo de reacciones que explican la transformación de amoníaco a nitrito (nitritación) por las bacterias (*Nitrosomonas*)

### NITRITACIÓN (Oxidación del amonio a nitrito)



En los medios de cultivo selectivo, para *Nitrobacter*, el sustrato empleado es a base de una sal de nitrito y micronutrientes. Para evaluar si se llevaba a cabo la transformación de nitrito a nitrato, a una muestra de cultivo se le adiciona el reactivo de Griess, la cual mostrará un color rosa/púrpura, si el nitrito sigue presente como sustrato. No obstante, si la muestra no presenta coloración, o bien, es amarillo paja, dicho sustrato se habrá transformado a nitrato.

En la nitrificación se da un flujo de electrones entre el citoplasma y el medio circundante, en éste, el nitrito que es el primer producto de la reacción por parte de las bacterias amonio-oxidantes (nitritantes), pasa rápidamente a través de la membrana de las bacterias nitrito oxidantes (nitratantes) y es oxidado a nitrato, el cual es liberado como producto final.

Debido a que el reactivo de Griess reacciona con el nitrito liberado durante la nitritación llevada a cabo por bacterias tipo nitrosomonas, da una coloración rosa púrpura, indicando así su presencia, por lo tanto cuando este producto no se encuentra presente en el medio, dicho evento no ocurre.

Para corroborar que la nitrificación ha tenido lugar se adiciona polvo de zinc metálico, el cual reduce al nitrato a nitrito, dando la coloración rosa púrpura anteriormente indicada. El sitio de estas reacciones no se encuentra determinado en membrana de las bacterias. Sin embargo, se ha observado que la reacción oxido-reducción del nitrito a nitrato, ocurre en el citoplasma y periplasma (medio externo) de las bacterias del tipo *Nitrobacter sp.*, Ferguson 1982, en Hooper (Figura 2)

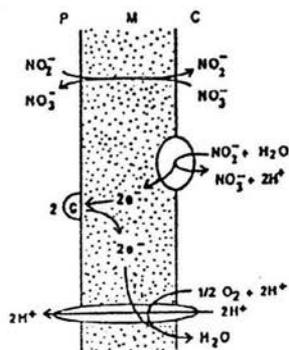


Figura 2.- Modelo del gradiente de electrones acoplado a la oxidación del nitrito por *Nitrobacter* (P = periplasma; M = membrana celular; C = citoplasma).

Por otra parte, la aplicación en conjunto de las pruebas BART, el Reactivo de Griess y el zinc, permiten detectar la actividad nitrificante, así como el reconocimiento de las bacterias involucradas en esa biotransformación.

**B) Pruebas de reacción biológica para nitrificantes (BART= Biological Activity Reaction Test).** Son bioensayos de reconocimiento fisiológico de diversos grupos, entre los cuales se encuentra uno específico para bacterias nitrificantes (Hach Company, 1995), un resultado positivo de estas pruebas es el desarrollo de biomasa después de 5 a 7 días, y la presencia de una coloración rosa en el medio líquido en que se incubó a temperatura ambiente la muestra de agua.

### II.5.3 Reconocimiento morfológico

De acuerdo a las características antes mencionadas, aplicando las técnicas de tinción, tales como: Gram y azul de metileno, se puede detectar la presencia de bacterias nitrificantes. El uso de microscopía electrónica de barrido y transmisión, permite reconocer con mayor detalle la morfología interna de las bacterias nitrificantes.

Como una estrategia de trabajo el reconocimiento de la actividad nitrificante y de las bacterias nitrificantes, es recomendable emplear técnicas de análisis fisicoquímicos y biológicos de manera simultánea, que permitan obtener información cuantitativa y cualitativa.

Para el presente trabajo, fueron seleccionadas las pruebas BART recomendadas para detección de bacterias nitrificantes. Este tipo de pruebas consta de un recipiente tubular con tapa de rosca de color blanco y una gris denominada de reacción. En su interior se encuentran tres esferas plásticas que flotan una vez que se ha colocado la muestra, éstas cumplen con dos funciones, una como medio para el establecimiento de las bacterias y, la otra, mediante el incremento de la interfase entre el aire y agua existente dentro del pequeño tubo. Estas características proporcionan las condiciones aerobias requeridas por las bacterias nitrificantes.

Una vez colocadas las muestras en los tubos de las pruebas BART, los resultados se obtienen después de cinco días de incubación entre 21 y 25°C. Posterior a este lapso, la tapa del tubo es cambiada por la de color gris. Con la finalidad de que ocurra la reacción entre la muestra y el compuesto de la tapa, para ello se invierte el tubo de 2 a 5 minutos. Transcurrido este tiempo se coloca el recipiente a su posición normal.

Para el análisis de resultados se consideran dos sitios de reacción, el primero en la parte superior de cada esfera, donde se observará el posible desarrollo de un color pardo, correspondiente al asentamiento de bacterias nitrificantes, en tanto que el segundo se detectará, en la solución o muestra, la cual deberá mostrar un color rosa o púrpura. La coloración de éstos es comparada con una carta de reacción que viene incluida con las pruebas y de acuerdo a su similitud con ésta se determina la presencia o bien ausencia de las bacterias nitrificantes.

### **II.5.3 Reconocimiento morfológico**

De acuerdo a las características antes mencionadas, aplicando las técnicas de tinción, tales como: Gram y azul de metileno, se pudo detectar la presencia de bacterias nitrificantes. El uso de microscopía electrónica de barrido y transmisión, permite reconocer con mayor detalle la morfología interna de las bacterias nitrificantes.

Como una estrategia de trabajo el reconocimiento de la actividad nitrificante y de las bacterias nitrificantes, es recomendable emplear técnicas de análisis fisicoquímicos y biológicos de manera simultánea, que permitan obtener información cuantitativa y cualitativa.

## II.6 LEGISLACIÓN SOBRE LAS DESCARGAS DE AMONIACO, NITRITO Y NITRATOS

La importancia que tiene el conocimiento de la nitrificación en el tratamiento de agua, y la necesidad de identificarla, es por un lado aseverar que la depuración biológica de aguas residuales es adecuada, disminuyendo así, el riesgo de contaminar cuerpos de agua naturales y suelo con amonio y nitrito, que deterioran la calidad fisicoquímica y biológica del cuerpo de agua receptor. En este sentido, la existencia de una legislación al respecto contribuye a preservar los ecosistemas naturales y a prevenir su contaminación.

En cuanto a la legislación referente a la descarga de amoniaco, nitritos y nitratos, en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites máximos permitidos de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (DOF, 1997), determina que estos contaminantes sean medidos en forma de nitrógeno total. Sin embargo, en la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua, publicada por la Comisión Nacional del Agua (CNA, 2002), dentro de su título segundo, correspondiente a los derechos en materia de agua, y de manera particular en su artículo 224 sección V, indica que "no se pagará el derecho por aguas que regresen a su fuente original o sean vertidas en cualquier otro sitio previamente autorizado por la Comisión Nacional del Agua. Lo anterior, siempre que cuenten con el respectivo certificado". En este sentido, es importante destacar los compuestos nitrogenados de particular importancia para el presente trabajo aparecen indicados como amoniaco, nitrito y nitrato (Tabla 1). Al respecto, de acuerdo a la calidad, corresponde el destino inmediato posterior que se le de al agua, lo cual deberá quedar debidamente especificado en el certificado de la declaración del ejercicio correspondiente. Asimismo, la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua, establece en el Capítulo XIV, Artículo 278-B, que los límites máximos permisibles de nitrógeno (nitrógeno total) susceptibles de ser descargados en cuerpos receptores tipo A y B como ríos con uso en riego agrícola, público y urbano, embalses naturales y artificiales con uso de riego agrícola, la concentración establecida es de 40 mg/L, mientras que para estuarios (cuerpos tipo B) es de 15 mg/L. Para el caso de cuerpos receptores tipo C, como son los ríos con uso para la protección de vida acuática; embalses artificiales y naturales con uso público urbano, acuíferos, es de 15 mg/L.

Tabla 1. Límites permisibles de descarga de amoniaco, nitritos y nitratos para diferentes tipos de agua

| PARÁMETROS | USOS |   |      |      |
|------------|------|---|------|------|
|            | 1    | 2 | 3    | 4    |
| mg/L       |      |   |      |      |
| Amoniaco-N | -    | - | 0.06 | 0.01 |
| Nitritos-N | 0.05 | - | -    | 0.01 |
| Nitratos-N | 5.0  | - | -    | 0.04 |

(Fuente: Ley Federal de Derechos en Materia de Agua (CNA, 2002))

Uso 1.- Fuente de abastecimiento para uso público urbano.

Uso 2.- Riego agrícola.

Uso 3.- Protección a la vida acuática: agua dulce, incluye humedales.

Uso 4.- Protección a la vida acuática: aguas costeras y estuarios.

En este contexto, es importante resaltar que esas concentraciones, podrían ocasionar problemas en los ecosistema acuáticos receptores, como sería el caso de eutroficación de embalses destinados a la protección de la vida silvestre y de abastecimiento para uso potable, eventualmente la autoridad deberá solicitar una menor concentración de nitrógeno en las descargas a cuerpos acuáticos receptores.

Por otra parte, en cuanto a normativas internacionales sobre agua para consumo humano, la Asociación Europea de Agua para Consumo Humano establece que el límite máximo permisible de compuestos del nitrógeno en aguas de abastecimiento para consumo humano es de 0.05 mg/L, 1999), lo cual también es estipulado la normatividad mexicana (CNA, 2002).

Partiendo de lo anterior, se pone en evidencia la importancia que tiene la eliminación de compuestos nitrogenados, como el amoniaco y nitrato, en los diferentes tipos de cuerpos acuáticos susceptibles de ser empleados como fuentes de abastecimiento de agua para consumo humano. Asimismo, debe considerarse que el no cumplir con la legislación vigente, en cuanto a la descarga de estos contaminantes, es motivo de sanciones, tales como el cierre parcial de las instalaciones y multas, en función de la concentración de contaminantes y volumen descargado.

En este contexto, el conocimiento del fenómeno de nitrificación, así como los factores que lo afectan y los métodos de detección rápida, son considerados elementos útiles para el control de las descargas de amonio, nitritos y nitratos presentes en aguas residuales y, consecuentemente, para la protección del ambiente (Purkhold *et al.*, 2000).

La oxidación autótrofa de amonio a nitrato en ambientes naturales, realizada por las bacterias nitrificantes, tiene un papel central en el ciclo del nitrógeno. Mientras que en las plantas de tratamiento biológico de aguas residuales su importancia radica en ser un paso intermedio de eliminación de compuestos nitrogenados, pudiendo con ello disminuir el riesgo de eutroficación de un cuerpo acuático y protegiendo, de esta manera, el equilibrio y dinámica de los ecosistemas.

### III OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

#### III.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar diferentes métodos de reconocimiento de la actividad nitrificante bacteriana en medios acuosos

#### III.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el proceso de nitrificación usando un cultivo bacteriano aclimatado
- Evaluar el crecimiento de bacterias nitrificantes en medios enriquecidos con sulfato de amonio
- Reconocer "*in situ*" la actividad nitrificante

### IV MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades desarrolladas en presente estudio se dividieron en dos etapas. La primera consistió en la obtención de cultivos enriquecidos de nitrobacterias, a estos se les aplicaron técnicas rápidas que permitieron efectuar el reconocimiento morfológico de este tipo de bacterias, así como de su actividad nitrificante (Figura 3 a ). La segunda hizo un seguimiento de la nitrificación bajo condiciones controladas y se aplicó las técnicas de análisis a una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (Figura 3b).

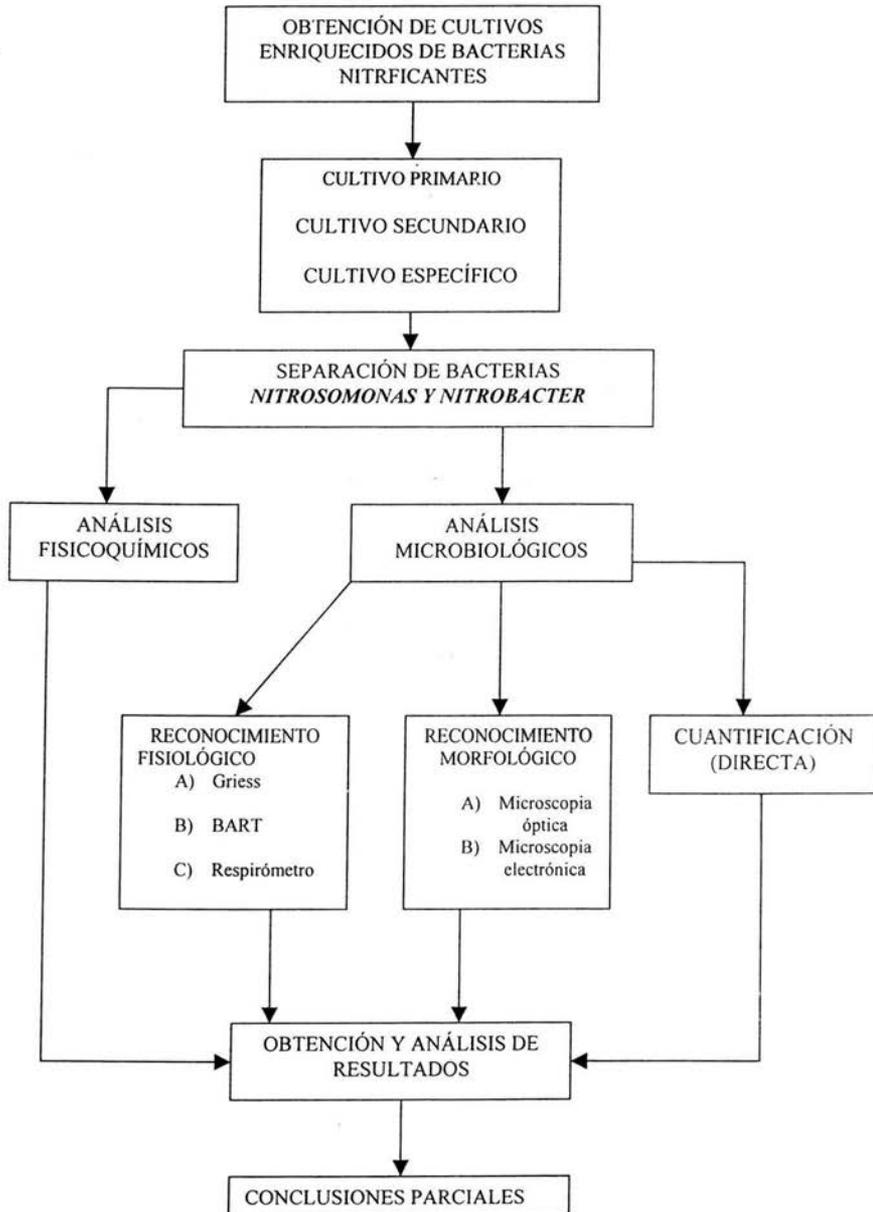


Figura 3a. Diagrama de la metodología seguida en la primera etapa experimental

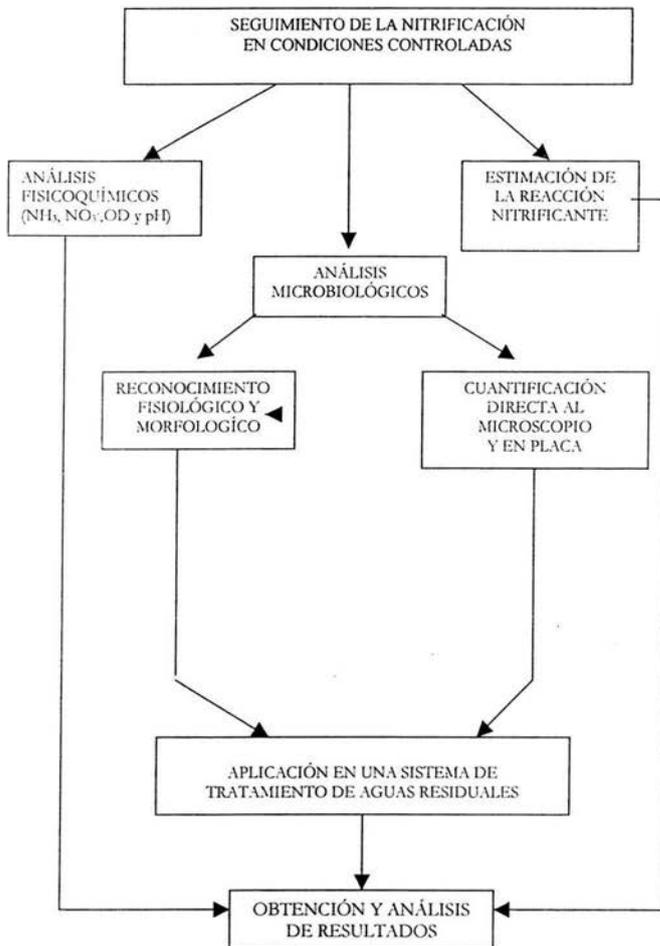


Figura 3b.- Metodología empleada en la segunda etapa experimental

## **IV PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL**

### **IV.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS ENRIQUECIDOS DE BACTERIAS NITRIFICANTES**

Como fuente de bacterias nitrificantes se emplearon tres tipos de muestras: a) Aguas conducidas por el Río Magdalena, que son en su mayoría de origen doméstico y consecuentemente ampliamente factibles de contener compuestos nitrogenados, así como de bacterias que los transforman; b) lodos de una planta que trata biológicamente aguas domésticas en los que en una experimentación previa se constató la presencia de bacterias nitrificantes, y c) suelo, sustrato en el que este tipo de bacterias es particularmente abundante.

#### **IV.1.2 Enriquecimiento bacteriano primario**

Con tal fin se siguieron tres procedimientos, en todos se emplearon recipientes de 1 L que contenían 900 mL de agua residual doméstica del Río Magdalena (ARD) y se hicieron las siguientes variaciones:

- A) Adición de 100 mL de una mezcla de "lodos" y suelo.
- B) ARD enriquecida con sulfato de amonio o de cloruro de amonio en una concentración de 100 mg/L (ARDESA)
- C) Adición de 100 mL de una mezcla de "lodos" y suelo, 100 mg/L de sulfato de amonio y como amortiguador 0.5 g de carbonato dibásico de potasio.

Todas las suspensiones se incubaron a temperatura ambiente y con aereación por 15 días. Durante este período diariamente se extrajo un volumen de 100 mL, en el caso A, este se restituyó con 100 mL de ARD, en B con una suspensión de sulfato de amonio o de cloruro de amonio y en C con la fuente de nitrógeno y el amortiguador.

En cada caso se efectuaron determinaciones fisicoquímicas y observaciones al microscopio a diferentes tiempos, a fin de detectar los cambios producidos, así como la presencia de las bacterias de interés.

#### **IV.1.3 Enriquecimiento secundario o específico de bacterias nitrificantes (cultivo D)**

Para asegurar la eliminación de materia orgánica y de otros microorganismos heterótrofos, así como, el enriquecimiento de bacterias nitrificantes, se procedió a resembrar el cultivo enriquecido B (ARDESA) en donde se observó la mayor abundancia de las bacterias de interés mediante el siguiente procedimiento.

Para favorecer el desarrollo específico de bacterias nitrificantes se hizo una primera resiembra en el medio de cultivo recomendado por Hanaki et al. (1990 a), suspensión que se incubó a 25° C y agitación durante 7 días. A partir de este cultivo se hicieron diluciones seriadas, empleando en cada una el 10 % en volumen de inóculo y como sustrato, una solución de sulfato de amonio con una concentración de 100 mg/ L (figura 4).

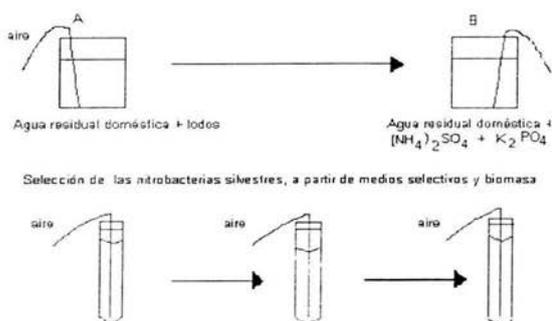


Figura 4. Elaboración de los inóculos para obtener bacterias nitrificantes

#### IV.1.4 Separación de bacterias nitritantes y nitratantes

A partir del cultivo enriquecido se tomaron muestras y se sembraron en dos medios selectivos (ver anexo 1), uno para *Nitrosomonas* (NS) y otro para *Nitrobacterias* (NB).

En ambos casos, cada tercer día se hicieron transferencias del cultivo a nuevas soluciones del medio, ello con el fin de evitar la inhibición del crecimiento por acumulación de subproductos metabólicos, así como, los cambios de pH que pudieran inhibir la actividad de las respectivas bacterias nitrificantes.

Durante el enriquecimiento específico, así como para la separación de bacterias nitrificantes, los cultivos se mantuvieron bajo oxigenación constante y a una temperatura de 25° C, condiciones que favorecen el crecimiento rápido de las bacterias nitrificantes (Stanley et al., 1981; Bortone et al., 1994; Homes et al., 1998; Strous et al., 1999).

## IV.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Para medir la actividad nitrificante de los cultivos se registraron las siguientes variables fisicoquímicas.

- Concentración de los iones amonio, mediante la técnica de Nessler.
- El contenido de nitratos se determinó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (APHA, 1998).
- El pH se midió con un multímetro Cornin 720-A.
- La alcalinidad mediante un método titulométrico (APHA, 1998)
- La temperatura y el oxígeno disuelto se registraron con un equipo Hach, que mide la concentración de oxígeno en mg/ L y la temperatura en grados Celsius (°C).

Para la determinación de los iones amoniacal y nitrato se elaboraron curvas patrón de referencia, tal como lo indican los métodos estándar americanos (APHA, 1998).

Cabe mencionar que inicialmente se contempló, el empleo de electrodos selectivos de amoniacal y nitrato para realizar las mediciones potenciométricas, sin embargo debido a que este tipo de análisis se recomiendan para el monitoreo preferentemente de aguas poco contaminadas, por lo que se considero para el presente estudio su aplicación podría ser limitada, en consecuencia, se optó por comparar los resultados de esta metodología con los obtenidos con otros métodos espectrofotométricos. Con tal fin, en una misma muestra de agua residual doméstica, se determinó la concentración de amonio y nitratos con dichos electrodos y además mediante la técnica de Nessler modificada para amonio, así como una técnica espectrofotométrica de luz ultravioleta para nitratos (APHA, 1998).

Los resultados obtenidos mostraron que en el caso del amonio ambas técnicas permitieron obtener valores semejantes, por lo que podría utilizarse una u otra. En tanto para el nitrato, la concentración de este ión fue 100 mg/L con el electrodo selectivo, lo cual no es coherente, si se considera el tipo de agua analizada, mediante el espectrofotómetro se obtuvieron datos entre 1 y 4 mg/L, siendo estos cercanos a lo esperado y reportado en la literatura, por lo cual en el caso del nitrato la lectura obtenida deberá dividirse entre un factor de 25, a fin de obtener una lectura real.

Lo anterior indica que los datos obtenidos mediante el empleo de electrodos son afectados por otros iones presentes en la muestra.

## IV.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.

### IV.3.1 Obtención de los organismos de interés

Como primer paso se trabajó con inóculos elaborados con agua residual doméstica, a la que se le adicionó sulfato de amonio y cloruro de amonio. Lo anterior con el objetivo de enriquecer las cepas silvestres de bacterias nitrificantes que pudieran ser empleadas en la siguiente etapa experimental.

Para asegurar la obtención de cultivos enriquecidos, se llevaron varias resiembras por dilución, empleando en cada una el 10% en volumen del inóculo y, como sustrato, una solución de sulfato de amonio en una concentración de 100mg/L figura 4 (ver IV.1.2 Enriquecimiento secundario).

Posteriormente, se procedió a la siembra de muestras de biomasa (entendiendo por biomasa, a las bacterias nitrificantes obtenidas a partir de los inóculos enriquecido con sulfato de amonio) en dos medios selectivos, uno para *Nitrosomonas* (NS) y otro para *Nitrobacterias* (NB). En ambos casos, cada tercer día se hicieron transferencias del cultivo a nuevas soluciones del medio, ello con el fin de evitar la inhibición de crecimiento por acumulación de subproductos metabólicos, así como, los cambios de pH que pudieran inhibir la actividad de las bacterias nitrificantes. Cabe señalar que tanto los inóculos iniciales, como los obtenidos en medios selectivos se mantuvieron bajo oxigenación constante y a una temperatura de 25°C, a efecto de favorecer un rápido crecimiento de las bacterias nitrificantes (Stanley *et al.*, 1981; Bortone *et al.*, 1994; Hommes *et al.*, 1998; Strous *et al.*, 1999).

#### IV.3.1.1 Observaciones microscópicas

Para facilitar el reconocimiento morfológico de las bacterias nitrificantes se hizo la observación microscópica de muestras extraídas de ARD, de los cultivos B, D y en los selectivos NS y NB. El muestreo se hizo cada tercer día y se aplicaron las siguientes técnicas:

- Observaciones in vivo con el microscopio de contraste de fases.
- Preparaciones temporales teñidas con azul de metileno.
- Preparaciones permanentes teñidas con las técnicas de Gram, Neisser y Negro Sudán. En estos casos se hizo la observación con microscopio de campo claro. Es conveniente aclarar que para la tinción con Negro Sudan a partir de los cultivos obtenidos se tomaron muestras a las que se les adicionó acetato de sodio y se cultivaron en condiciones anaerobias, lo que favorece la acumulación de polihidroxibutirato (PHB) en bacterias del género *Nitrobacter*, lo que permite diferenciarlo de *Nitrosomonas*.

- Microscopía electrónica de transmisión, para lo que se empleó un equipo Jeol 1200 EXII, con las siguientes características: magnificación 50x – 600 000X; resolución aprox. 4 angstroms y cámara fotográfica con placas de 3 ¼ x 4" (Película 4489 y SO-163. Esta actividad se realizó en el laboratorio de microscopía electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

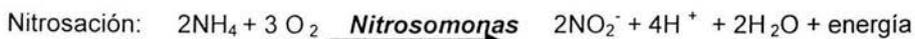
### IV.3.2. Ensayos fisiológicos

La determinación de la actividad nitrificante se realizó en cultivos enriquecidos y en cultivos en los que se emplearon medios selectivos tanto para bacterias amonio-oxidantes (*Nitrosomonas*), como para bacterias nitro-oxidantes (*Nitrobacter*). Para poner de manifiesto dicha actividad se empleó el reactivo de Griess y en forma complementaria las pruebas BART.

#### IV.3.2.1 Detección de la actividad nitrificante con el reactivo de Griess

El reactivo de Griess es un compuesto ácido incoloro elaborado a partir de ácido fosfórico, sulfanilamida y n-naftil-etilendiamida, el que al reaccionar con los nitritos da lugar a la formación del p sulfabenceno azo alfa naftilamina que es un compuesto de color rosa-violeta (Schade y Lemmer, 1994; Hommes et al., 1998).

Por otra parte considerando lo indicado en el capítulo II, se tiene que el proceso de nitrificación comprende 2 fases de transformación (ver reacciones), se tiene que la aparición de un color rojo o púrpura en un cultivo de bacterias nitrificantes después de la adición del reactivo de Griess constituye un indicativo de que se llevo a cabo la primera fase de la transformación.



En tanto que una reacción incolora o bien con un color amarillo pálido indica dos posibilidades:

- a) Reacción negativa por la presencia del sustrato que no fue oxidado a nitritos
- b) Reacción falsa negativa de nitrificación, la que está dada por la presencia de nitratos. Es decir que se efectuó el proceso completo en donde los nitritos fueron oxidados a nitratos.

Para discernir entre estas posibilidades, se agrega zinc metálico, el que en la segunda posibilidad reduce los nitratos a nitritos con la consecuente aparición del color púrpura lo que indica que la reacción de nitrificación fue positiva.

### **IV.3.2.2 Pruebas de reacción biológica para nitrificantes (BART)**

En este tipo de pruebas se utiliza un recipiente tubular con tapa de rosca de color blanco y una gris denominada de reacción. En su interior se encuentran tres esferas plásticas que flotan una vez que se ha colocado la muestra, éstas cumplen dos funciones, una como medio para el establecimiento de las bacterias y, la otra mediante el incremento de la interfase entre el aire y agua existente dentro del pequeño tubo. Estas condiciones proporcionan las condiciones aerobias requeridas por las bacterias nitrificantes.

Una vez colocadas las muestras en los tubos de las pruebas BART, los resultados se obtienen después de cinco días de incubación entre 21 y 25° C. Después de este tiempo, la tapa del tubo se cambia por la de color gris y se invierte el tubo (lo que facilita la reacción entre la muestra y el compuesto de la tapa) de 2 a 5 minutos. Transcurrido este tiempo se coloca el recipiente en posición normal.

Para la interpretación de los resultados se consideran dos sitios de reacción, el primero en la parte superior de cada esfera, donde se observará el posible desarrollo de un color pardo, correspondiente al asentamiento de bacterias nitrificantes, en tanto que el segundo se detectará en la solución o muestra, la cual deberá mostrar un color rosa o púrpura. La coloración de estos se compara con una carta de reacción que viene incluida con las pruebas y de acuerdo a su similitud con ésta se determina la presencia o bien la ausencia de bacterias nitrificantes.

### **IV.3.3 Ensayos respirométricos**

En el caso particular de la nitrificación mediante el consumo de oxígeno, es posible hacer una estimación de la velocidad de oxidación del sustrato amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) al producto nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) mediante la siguiente fórmula, la que permitirá calcular la disminución del amoníaco y el aumento de nitratos.

Para establecer la oxidación de amoníaco a nitrato se consideró la siguiente relación: 1 mgOD/L registrados en el respirómetro =  $1/5$  mg  $\text{N-NH}_3/\text{L}$

En estos ensayos, el consumo de oxígeno se registró en un respirómetro automático marca Voith-Sapromat B-12, para ello se emplearon 6 matraces (1 testigos y 5 inoculados con bacterias nitrificantes en una proporción de 250 agregados/ mL, estos últimos obtenidos en los cultivos de enriquecimiento). En todos los casos, de acuerdo con las condiciones óptimas para el proceso de nitrificación reportadas por Anthonisen et al., (1976), el medio de cultivo se ajustó a un pH de 8.0 unidades y posterior a la inoculación, los matraces se mantuvieron a 25° C y bajo oxigenación y aireación constantes.

Con estas condiciones se realizaron 3 corridas experimentales, en las que se varió la concentración y fuente de nitrógeno. En cada caso, las lecturas se efectuaron con intervalos de 15 minutos durante la primera hora, después cada 60 minutos hasta la hora 5, y las siguientes lecturas a las 24, 48, 72 y 96 h.

A partir de las 24 h. adicionalmente al registro del consumo de oxígeno, se determinaron las siguientes variables fisicoquímicas OD, pH y alcalinidad. Complementariamente se aplicó a muestras procedentes de los matraces de reacción el reactivo de Griess para confirmar que la reacción (presencia del producto intermedio, NO<sub>2</sub>) se estaba llevando a cabo y se cuantificaron los agregados bacterianos.

La concentración y fuentes de nitrógeno utilizadas en las tres corridas experimentales corresponden a:

Primera 10 mg/ mL de sulfato de amonio.

Segunda 100 mg/ mL de cloruro de amonio

Tercera 10 mg /mL de cloruro de amonio

#### **IV.3.4 Cuantificación de bacterias nitrificantes**

A partir de los cultivos antes indicados se tomaron alícuotas de 0.1 mL, las que se emplearon para hacer observaciones directas con el microscopio de contraste de fases, así como, preparaciones temporales que se tiñeron con azul de metileno, procediéndose a contar los agregados bacterianos.

### **IV.4 SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL**

#### **IV.4.1 SEGUIMIENTO DE LA NITRIFICACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS.**

Con tal fin se emplearon dos reactores de un volumen cada uno de 100 mL. A estos se les adicionó el medio de cultivo específico para el desarrollo de bacterias nitrificantes (Hanaki et al., 1990), el que contenía 24 mg/ L de amoníaco y se inocularon con 10 mL del cultivo D obtenido en la primera etapa

Uno de los reactores se mantuvo cerrado y el otro fue aireado y ambos se mantuvieron a 25° C durante 24 horas. Las características operativas de estos se describen en la siguiente tabla.

Tabla 2.- Características operativas de los cultivos en reactores experimentales

| Parámetro  | Literatura | Reactor*<br>experimental |
|--|------------|--------------------------|
| Oxígeno disuelto (mg/L)                                | 4.3-4.6a   | 4.4                      |
| Temperatura (°C)                                       | 25-30b     | 28                       |
| Alcalinidad (mgHCO <sub>3</sub> /L)                    | 7.14b      | 7.14                     |
| Ph (unidades)  | 7.5 a 8.6c | 8.0                      |
| Tiempo de retención celular<br>(TRC en días)           | 20-30d     | 25                       |
| Tiempo de retención hidráulico<br>(TRH en días)        | 3-7        | 5                        |
| Concentración de amoníaco<br>(mg N-NH <sub>3</sub> /L) | 10-100     | 50                       |

*Nota: Datos tomados de: a Prosser, 1992; b Le-Bihan, 1995; c Metcalf y Eddy, 1991; d Bortone et al., 1994.*

*\*Los intervalos de las condiciones de operación propuestos son un promedio de los que la literatura reporta como óptimos para el proceso de nitrificación.*

A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 10 ml en las que se determinaron la concentración de amoníaco, nitratos, ph y cantidad de bacterias nitrificantes de acuerdo a la metodología antes indicada

#### IV.4.2 APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE NITRIFICACIÓN EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA

Con este propósito se seleccionó la Planta de Tratamiento de agua de Ciudad Universitaria (PTARCU). El estudio se realizó en la etapa media de la época de lluvias, en la que la planta se encuentra operando de manera estable. Para ello se tomaron muestras del sistema de lodos activados una vez por semana durante 3 semanas continuas y se procedió a evaluar la actividad nitrificante mediante la determinación de las características fisicoquímicas y microbiológicas descritas.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 Primera etapa

#### V.1.1 Caracterización fisicoquímica de aguas residuales de origen doméstico.

En la tabla 3 se presentan los resultados de las variables fisicoquímicas determinadas en el Agua residual doméstica del Río Magdalena (ARD). En esta se observa que la concentración de oxígeno disuelto y valores de pH se encuentran en rangos en el que se reporta una actividad nitrificante baja (Metcalf y Eddy, 1990; Prosser, 1992; Münch et al., 1996).

Normalmente a estas concentraciones de OD se presenta una acumulación de nitritos, los que tienden a desaparecer cuando el OD supera la concentración de 2.8 mg/ L. En tanto que el pH óptimo para la nitrificación fluctúa de 7.3 a 8.6 (Münch et al., 1996)

Respecto al contenido de amoníaco los valores son bajos lo que aunado a las otras variables fisicoquímicas indican que en este tipo de agua el proceso de nitrificación es bajo lo que coincide con las cantidades de nitratos encontradas que resultaron también bajas.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales conducidas por el Río Magdalena.

| Parámetro   | Descripción   |
|---|---------------|
| Oxígeno disuelto (mg/L)                               | $1.2 \pm 0.2$ |
| pH (unidades)   | $7.3 \pm 0.5$ |
| Amoniaco (mg N-NH <sub>3</sub> /L)                    | $11 \pm 1.2$  |
| Nitratos (mg N-NO <sub>3</sub> -/L)                   | $1.0 \pm 0.2$ |
| Demanda química de oxígeno (DQO mg O <sub>2</sub> /L) | $286 \pm 30$  |

#### V.1.2 Obtención de cultivos enriquecidos de bacterias nitrificantes.

En las observaciones realizadas al microscopio de los cultivos primarios (A, B y C), durante las dos primeras semanas se detectaron microorganismos eucariotes tales como flagelados, ciliados, suctores, micrometazoos, nematodos y rotíferos. De igual forma se observaron procariontes tanto en forma dispersa, como en filamentos y en agregados, destacándose la presencia de Zooglea sp.

La composición de la comunidad microbiana observada es lógica, si se considera que las aguas domésticas, lodos y suelo contienen materia orgánica que favorece la proliferación de microorganismos heterótrofos.

Respecto a los agregados semejantes a bacterias nitrificantes, estos fueron más abundantes en el cultivo B (ARDESA) a partir del cual se hizo el enriquecimiento secundario (D), en el que como era de esperarse, la diversidad de organismos heterótrofos disminuyó, observándose de manera simultánea el aumento de bacterias nitrificantes, así como escasas algas filamentosas. Aún cuando se registró un aumento de estos dos grupos, en general se presentaron en baja proporción.

En las preparaciones temporales teñidas con azul de metileno, las bacterias nitrificantes pudieron ser reconocidas en forma de agregados esféricos, rodeados por una membrana gelatinosa (Figura 5 y 6). En tanto que en las preparaciones permanentes su reacción fue negativa a la reacción de Gram observándose de color rojo y positiva a la de Neisser en tonos azules.

### V.1.3 Separación de bacterias nitritantes y nitratantes

La separación de estas bacterias se logró después de varias resiembras, lo que se confirmó mediante el reactivo de Griess. Procediéndose a la observación microscópica de cultivos de nitritantes (*Nitrosomonas*), así como de nitratantes (*Nitrobacter*).

Los primeros fueron denominados NS y los segundos NB. Los agregados observados se muestran en las figuras 8 a 15

Las bacterias nitrificantes identificadas, mediante del análisis al microscopio electrónico de transmisión, como *Nitrosomonas sp* se muestran en las figuras 16, 17 y 18, obtenidas. En éstas se pueden observar el complejo de membranas que conforma individualmente a cada bacteria integrante del agregado.

En tanto que las identificadas como *Nitrobacter sp*, se observan en las figuras 19 y 20. Se distinguen de las *Nitrosomonas sp* por la presencia de gránulos de PHB.

### V.1.4 Resultados de cambios físicos y químicos registrados en los cultivos enriquecidos

En las tablas 4 y 5 se observa que los cultivos del enriquecimiento primario que se incubaron a temperatura ambiente se mantuvieron a una temperatura por debajo del intervalo teórico de 25 a 30 ° C recomendado para el crecimiento óptimo de las bacterias nitrificantes.

En el caso del cultivo primario A (tabla 4) el pH se mantuvo constante, en tanto que en el cultivo de enriquecimiento primario B (tabla 5), aún cuando se agregó fosfato dibásico como amortiguador, el pH disminuyó alrededor de 1 unidad. Este cambio pudo deberse a la acumulación de ácido nitroso, por lo que puede interpretarse como un indicador del proceso de nitrificación.

Lo anterior se corrobora con las concentraciones de amoníaco y nitrato que disminuyen y aumentan respectivamente. Es importante recordar que el amoníaco se adicionó originalmente en una concentración de 100 mg/ L del medio de cultivo, por lo que los valores registrados indican que se transformó entre el 40 y 45 % del mismo.

La acidificación también se presentó en los cultivos selectivos para *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Al tercer día de incubación se registraron valores de 5.9 en el caso de *Nitrosomonas*, y de 6.2 en los cultivos de *Nitrobacter*; por lo que para asegurar el crecimiento de estas bacterias se adicionó una solución amortiguadora de carbonato de potasio, lo que permitió reestablecer el pH óptimo.

Tabla 4. Registro de los parámetros fisicoquímicos del inóculo ARD

| Día | Temperatura (°C) | OD (mg/L) | pH (unidades) | N-NH <sub>3</sub> (mg/L) | N-NO <sub>3</sub> (mg/L) |
|-----|------------------|-----------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| 3   | 19               | 3.5       | 7.8           | 2.5                      | 1.8                      |
| 6   | 21               | 3.5       | 7.8           | 2.5                      | 2.2                      |
| 9   | 22               | 3.1       | 7.8           | 2.5                      | 5.0                      |
| 12  | 22               | 2.8       | 7.8           | 2.5                      | 5.2                      |
| 15  | 22               | 3.0       | 7.8           | 2.8                      | 5.6                      |

Tabla 5. Registro de los parámetros fisicoquímicos del inóculo ARDESA

| Día | Temperatura (°C) | OD (mg/L) | pH (unidades) | N-NH <sub>3</sub> (mg/L) | N-NO <sub>3</sub> (mg/L) |
|-----|------------------|-----------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| 3   | 19               | 3.8       | 7.0           | 45                       | 2.7                      |
| 6   | 21               | 3.8       | 6.4           | 45                       | 3.0                      |
| 9   | 22               | 3.6       | 5.9           | 45                       | 3.5                      |
| 12  | 22               | 3.8       | 5.9           | 45.5                     | 4.5                      |
| 15  | 22               | 3.6       | 5.8           | 55                       | 5.3                      |

## V.1.5 Análisis microbiológicos

### V.1.5.1 Observaciones microscópicas

En las figuras 5 a 20 se muestran las microfografías que resultaron de la observación con el microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión, señalándose en cada caso la técnica de tinción empleada y tipo de bacteria.

En la literatura especializada se reporta que las bacterias nitrificantes se observan como agregados y cuando se trabaja con cepas puras aisladas de suelo o agua que han sido cultivadas en laboratorio se observan en forma individual (Stanley Manley, 1971; Holt et al., 1999).

En este estudio únicamente se observaron agregados constituidos por un número variable de bacterias en forma de bastones o bien elipsoidales y en la mayoría de los casos las bacterias no se observaron bien definidas, percibiéndose como masas difusas de diferentes formas, cuyo color varió con el tipo de tinción empleada. Observándose agregados azul violáceo con la técnica de azul metileno (figuras 5, 6 y 7); como grumos rojos con la tinción de Gram (figuras 8 y 9), lo que coincide con la reacción negativa al Gram reportada (Holt et al., 1999), o bien como agregados morados con la técnica de Neisser (figuras 10, 11 y 12), que es recomendada para poner de manifiesto aquellas bacterias que por su metabolismo liberan iones fuertemente ácidos como es el caso de las nitrobacterias, lo que permite diferenciarlas de otras bacterias presentes en los cultivos.

Por otra parte se tiene que en las figuras 13 y 14 los gránulos de PHB teñidos en morado permiten diferenciar los agregados constituidos por *Nitrobacterias* de aquellos agregados formados por *Nitrosomonas* que se observan en rojo.

Las preparaciones en fresco que se observaron en el microscopio de contraste de fases corresponden a aquéllas en las que se logró una mejor observación de la delimitación de los agregados. (figura 15).

A pesar de que las bacterias nitrificantes se encontraron tanto en forma de agregados difusos como en forma individual, estas pueden ser cuantificadas de manera directa, con el uso del microscopio de contraste de fases ya sea contando los agregados, o bien, a las bacterias presentes de manera individual.

Los agregados o grumos corresponden a consorcios microbianos, estos al igual que el enquistamiento son estrategias empleadas por la mayoría de los microorganismos para sobrevivir en condiciones adversas sin perder su individualidad. Por lo que no fue sorprendente que estos se observaran en el agua residual doméstica, en los lodos activados de la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria, especialmente si se considera que los parámetros físicos y químicos registrados no eran óptimos para el desarrollo de las bacterias nitrificantes.

En las micrografías tomadas con el microscopio electrónico (figuras 16 a 20) se observan también agregados formados por un número variable de bacterias, por lo cual el tamaño de estos también es variable, oscilando entre 12 y 20  $\mu\text{m}$ . En estas se observan la membrana externa, septos de división celular, carboxisomas e inclusiones. Los sistemas membranales e inclusiones observadas corresponden a las características reportadas por Stanley y Mandley (1971) y en el Manual de Bacteriología de Bergey (Holt, 1999).

Estos resultados permitieron confirmar que se logró el enriquecimiento de este tipo bacterias, aunque debido a su lento crecimiento, su cantidad fue baja.



Figura 5.- Aspecto de los agregados bacterianos nitrificantes obtenidos de los cultivos ARDESA, teñidos con azul de metileno (10 x)

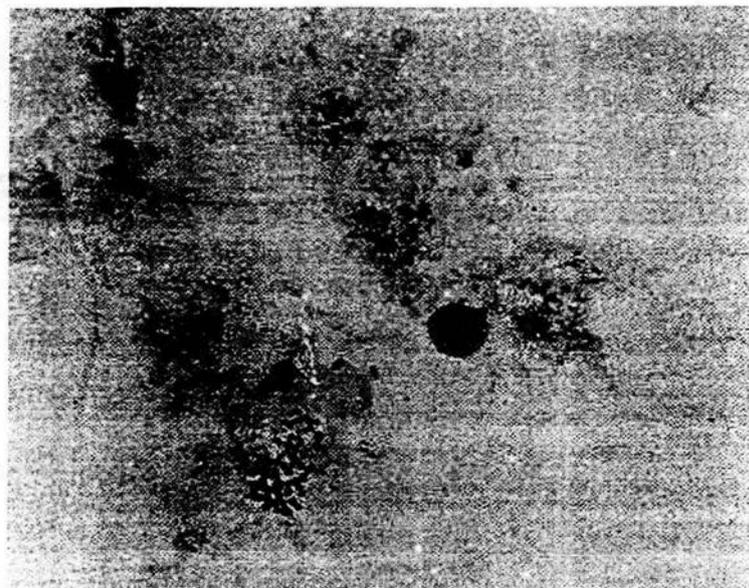


Figura 6.- Agregado bacterianos obtenidos del cultivo ARDESA, teñido con azul de metileno (20 x)

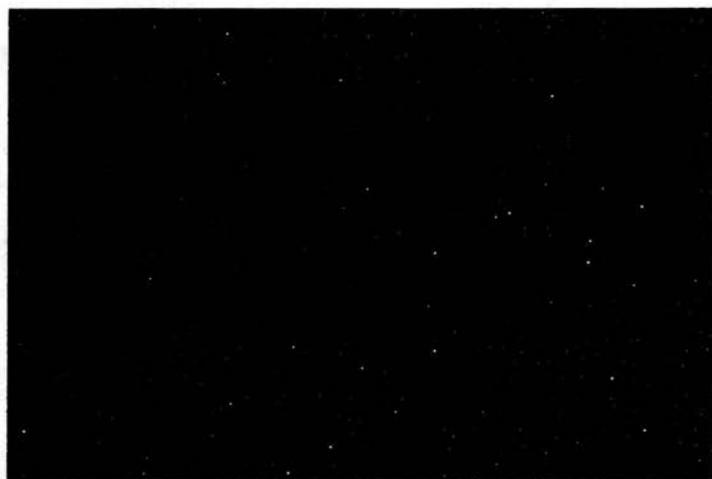


Figura 7.- Agregados bacterianos de los cultivos NS observados con azul de metileno (100 x)

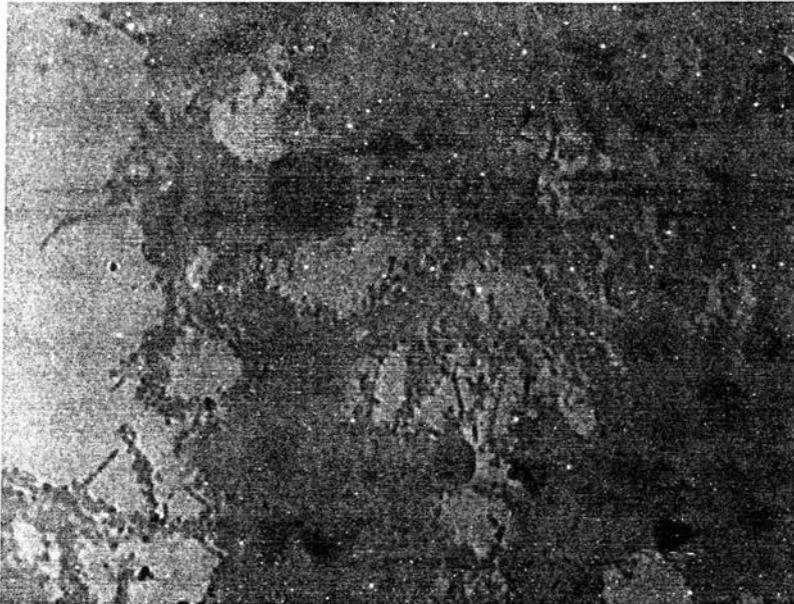


Figura 8.- Agregados bacterianos teñidos (cultivo NS) en rojo empleando la técnica de Gram (40 x)

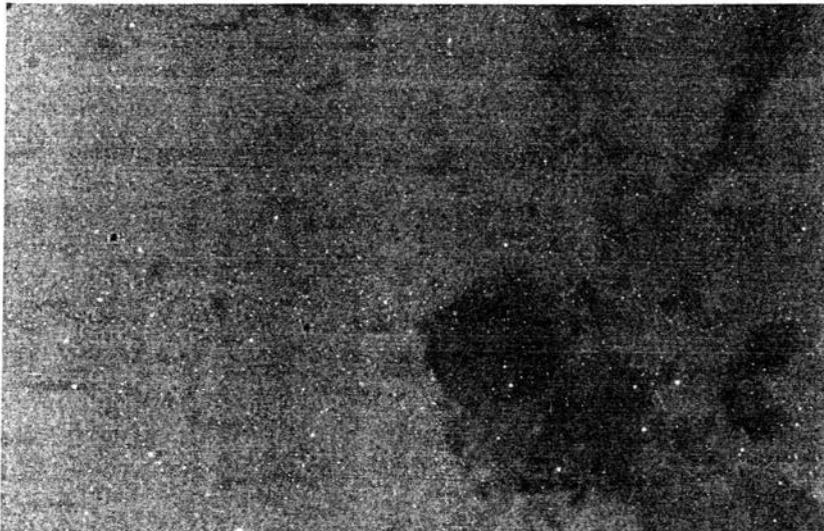


Figura 9.- *Nitrosomonas* sp., obtenidas de cultivos selectivos y teñidas en rojo empleando la técnica de Gram (40 x)



Figura 10.- Agregados bacterianos nitrificantes obtenidos del cultivo NS teñidos con Neisser (40 x)



Figura 11.- Agregados bacterianos nitrificantes del cultivo NS teñidos con Neisser (100 x)



Figura 12.- Agregados bacterianos nitrificantes obtenidos del cultivo NB teñidos en azul con Neisser (40 x)



Figura 13.- Agregados de Nitrobacter obtenidos del cultivo NB, teñidos en rojo empleando la tinción safranina 0 y Sudan IV (40 x)

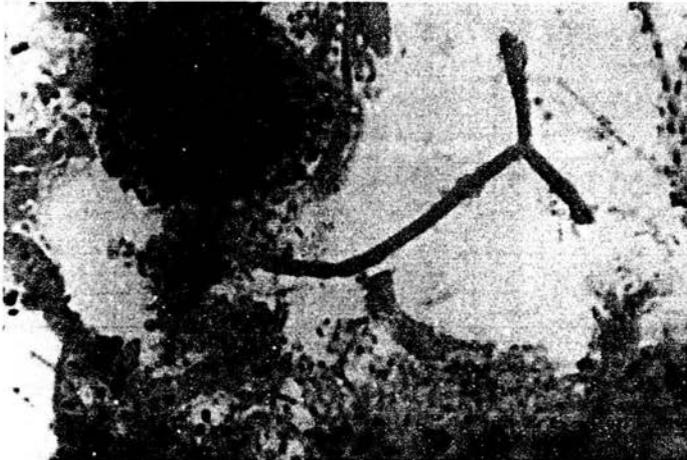


Figura 14.- Agregado de *Nitrobacter* obtenido del cultivo NB teñido en rojo empleando safranina 0 y con Sudan IV (100x)

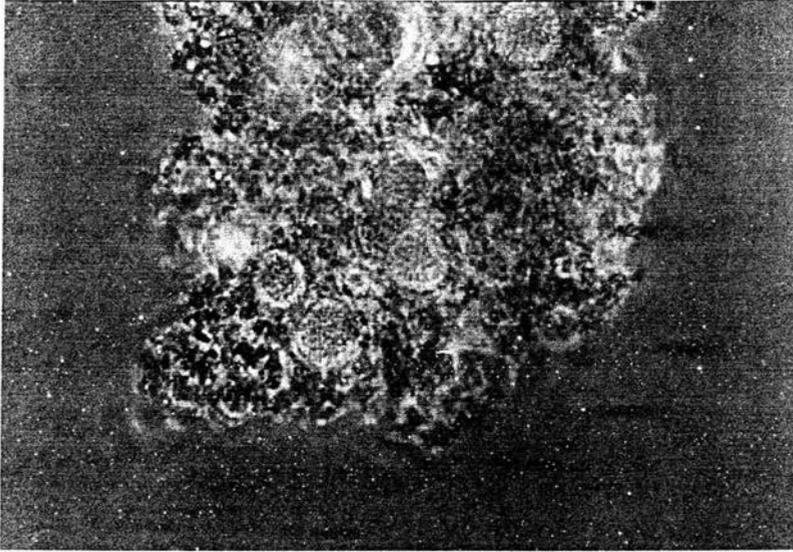


Figura 15.- Agregados bacterianos observados durante los ensayos respirométricos observados con iluminación de contraste de fases (40 x)

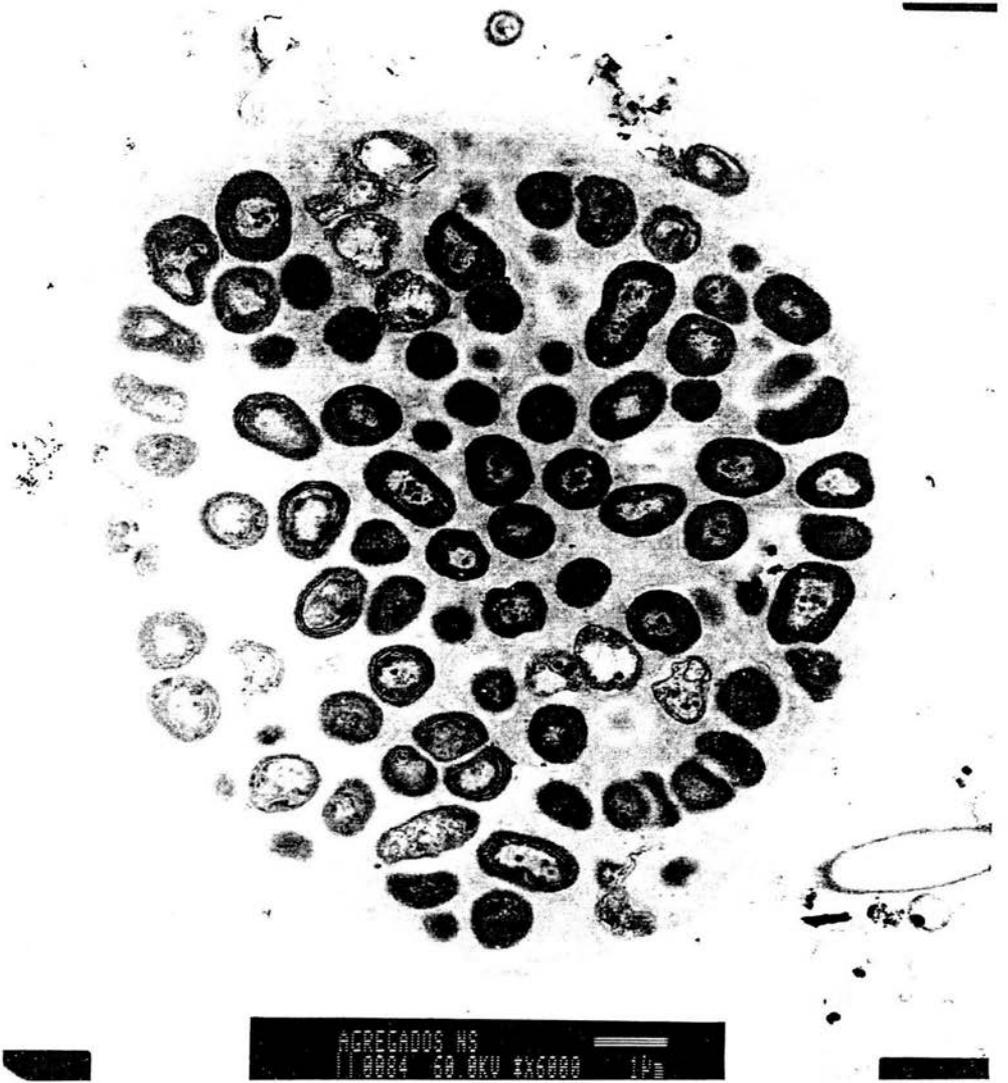


Figura 16.- *Nitrosomonas sp.* observadas con la técnica de microscopía electrónica de transmisión

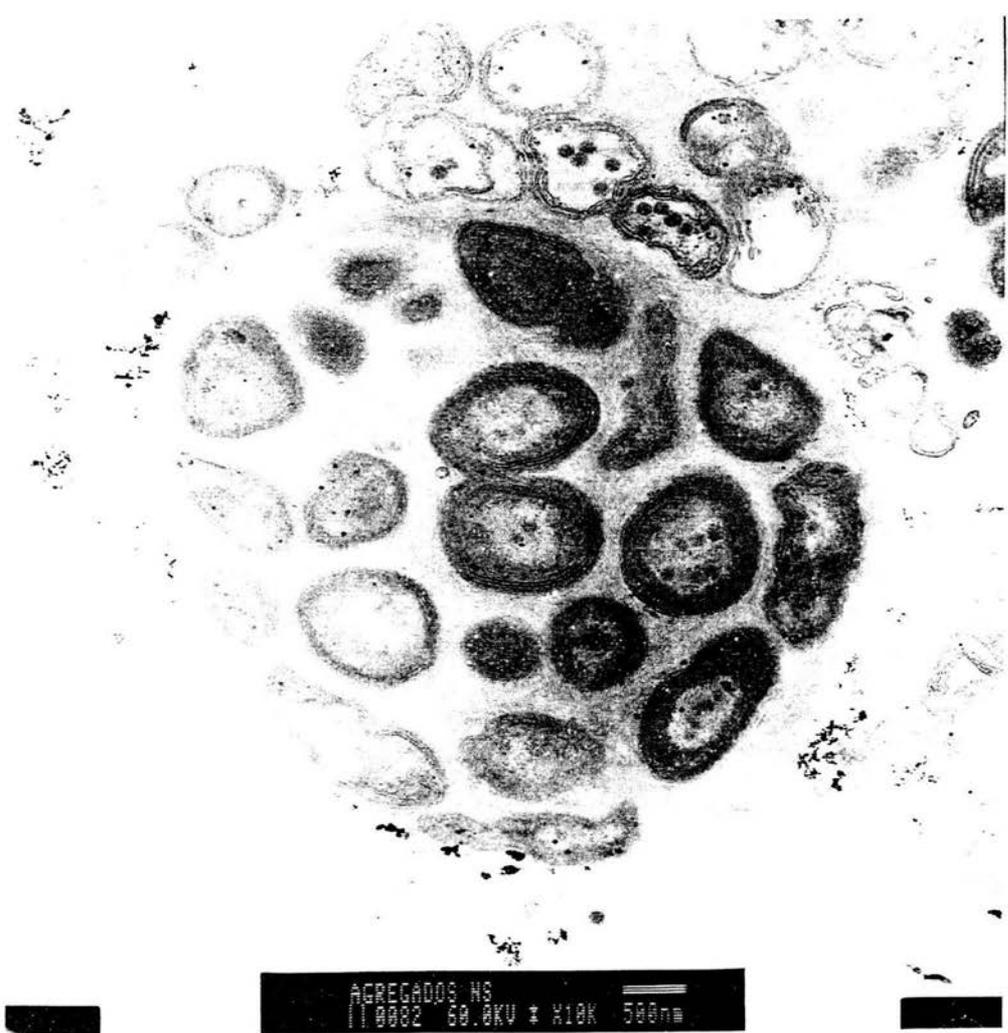


Figura 17.- Imagen ampliada de *Nitrosomonas sp.* conformando agregados. Fotomicrografía tomada empleando microscopio electrónico de transmisión

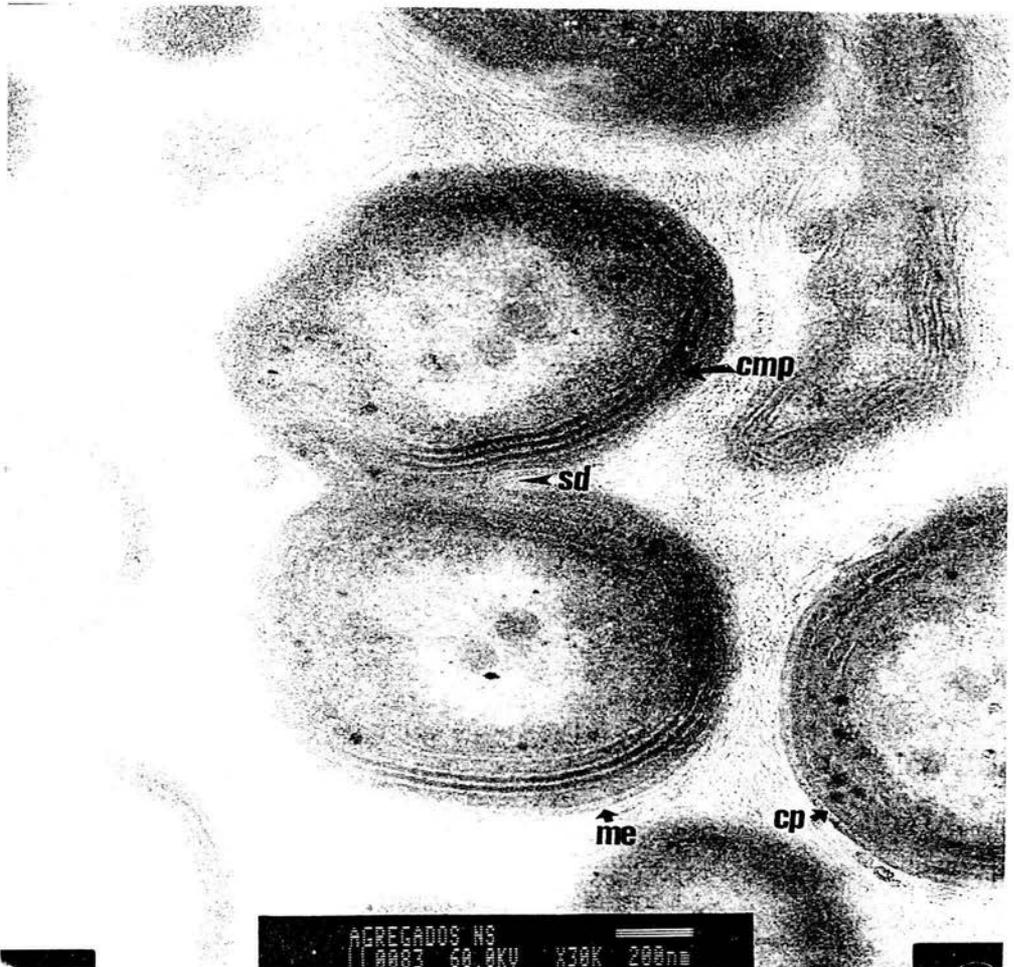


Figura 18.- Proceso de división de *Nitrosomonas sp.*, imagen observada al microscopio electrónico de transmisión

**Nota:**

CMP= Complejo de membranas plasmáticas

PC= Pared celular

SD= Septo de división

ME= Membrana externa



Figura 19.- Agregados de *Nitrobacter sp.*, mostrando inclusiones de PHB, extraídos de un cultivo sometido a condiciones anaerobias en presencia de acetato de sodio. Imagen observada al microscopio electrónico de transmisión



Figura 20.- Agregados de *Nitrobacter sp.*, mostrando inclusiones de PHB. Observación realizada al microscopio electrónico de transmisión.

Tomando como referencia los resultados obtenidos y la información en la literatura especializada, se elaboró la tabla 3. En dicha tabla se anotan las características comunes y distintivas de los grupos amonio-oxidantes (*Nitrosomonas*) y nitrato-oxidantes (*Nitrobacter*).

Cabe señalar que las ventajas que tiene diferenciar y reconocer a las bacterias nitrificantes de manera rápida, ya sea empleando su morfología y/o fisiología, en un sistema de tratamiento, y en estudios de diversidad bacteriana en un medio, entre otros, representa, una reducción en el tiempo vertido en el análisis de su determinación.

Asimismo, su papel como bioindicadores resulta una herramienta económica disponible para diversos estudios de campo y laboratorio.

Tabla 6a. Características de las bacterias nitrificantes consideradas para el presente estudio de acuerdo con Sharma y Ahlert (1977), Holt (1999).

| Característica   | <i>Nitrosomonas</i>   | <i>Nitrobacterias</i>   |
|--|---|---|
| Morfología:  | Bastones y esférica   | Bastones, piriformes, esférica y espirilos, cocos                                       |
| Forma de crecimiento   | En la naturaleza y medios enriquecidos se observan a veces agrupados en "cistos" o quistes con zooglea. Las <i>Nitrosomonas</i> se pueden agregar en pares o cadenas cortas |   |
| Citomembranas  | Región periférica, central o dispersas. En forma laminar aplanada   | Región polar, en número de 4 a 6. En forma de láminas aplanadas o estructuras tubulares |
| ADN (G+C% mol)   | 60-62   | 45-54   |
| Inclusiones celulares  | Polifosfato y carboxisomas  | PHB, carboxisomas, glicógeno y polifosfato  |
| Tamaño (micras)  | 1-1.5   | 0.5-1   |
| Tipos de citocromos  | Ambas presentan a y c   |   |
| Tiempo de reproducción (hrs)                                 | 8-36  | 12-59   |
| Tipo de reproducción   | Fisión binaria  | Gemación o fisión binaria   |
| Movilidad<br>Pueden o no presentar, cuando existe se da por: | Flagelos polares, subpolares y peritricos en número variable de 1 a 20  | Flagelos polares o subpolares en número de 1 o 2  |
| Habitat  | Ambas se pueden encontrar en suelo, aguas residuales, dulces y marinas  |   |
| Fisiología:  |   |   |
| Tiempo de crecimiento en medios de cultivo                   | Por los menos 8 días  | 4 meses   |
| Tipo de nutrición  | Heterótrofa   | Quimiótrofa   |
| Requerimiento de oxígeno                                     | Aerobias  | Aerobias y facultativas   |
| Sustrato   | Amoniaco  | Nitrato y material orgánico   |
| Reacción ante las tinciones de: Gram*                        | Negativa  | Negativa  |
| Corpúsculos metacromáticos*                                  | Positiva  | Positiva  |
| Sudan negro*   | Negativa  | Positiva  |

Tabla 6b. Características de las bacterias nitrificantes observadas en el presente estudio

| Característica   | <i>Nitrosomonas</i>   | <i>Nitrobacterias</i>   |
|--|---|---|
| Morfología:  | Esférica  | Esférica  |
| Forma de crecimiento   | AGREGADOS   |   |
| Citomembranas  | Región periférica, central o dispersas. En forma laminar aplanada               | Región polar, en número de 4 a 6. En forma de láminas aplanadas o estructuras tubulares |
| Inclusiones celulares  | Polifosfato y carboxisomas  | PHB, carboxisomas, glicógeno y polifosfato  |
| Tamaño (micras)  | 1-1.5   | 0.5-1   |
| Tiempo de reproducción (hrs)                                 | 8-36  | 12-59   |
| Tipo de reproducción   | Fisión binaria  | Gemación o fisión binaria   |
| Movilidad<br>Pueden o no presentar, cuando existe se da por: | Sin movilidad   |   |
| Habitat  | Suelo, aguas residuales y cultivos enriquecidos con sulfato y cloruro de amonio |   |
| Fisiología:  |   |   |
| Tiempo de crecimiento en medios de cultivo                   | Por los menos 8 días  | 4 meses   |
| Tipo de nutrición  | Heterótrofa   | Quimiótrofa   |
| Requerimiento de oxígeno                                     | Aerobias  | Aerobias y facultativas   |
| Sustrato   | Amoniaco  | Nitrito y material orgánico   |
| Reacción ante las tinciones de: Gram*                        | Negativa  | Negativa  |
| Neisser*   | Positiva  | Positiva  |
| Sudan negro*   | Negativa  | Positiva  |
| Reacción al reactivo de Griess (coloración de la muestra)*   | Incoloro/amarillo paja  | Rosa/púrpura  |

### V.1.5.2 Resultados de la actividad nitrificante.

La coloración del medio donde las *Nitrosomonas* oxidan el amoniaco a nitrito, se debe a que después de llevarse a cabo dicha oxidación en el citoplasma (medio interno), el producto es liberado al exterior (periplasma), por lo que al añadirse el reactivo de Griess, específico para indicar presencia de  $\text{NO}_2^-$ , se lleva a cabo la reacción, encontrándose como sustrato disponible para ser transformado a nitrato por las *Nitrobacterias* (Hooper y DiSpirito, 1985).

El reactivo de Griess adicionado a los medios, previo al período de incubación de las pruebas BART, manifestó actividad nitrificante, observándose una coloración rosa en la muestra, lo que indica la desaparición de sustrato y formación de producto.

En adición a lo anterior, es importante mencionar que en una mezcla del medio cultivo para NB más el reactivo de Griess, se observó una coloración rosa, indicando la presencia del nitrito, y al momento del recambio del medio, una vez transcurridos tres días, una muestra con el reactivo adquirió el tono de amarillo paja, señalando la ausencia del  $\text{NO}_2^-$ . Mientras que en SA siempre se conservó el rosa manifestando la presencia del ión, indicando la transformación de amonio a nitrito.

Las pruebas BART para la detección de organismo nitrificantes fueron positivas en el cultivo primario B (Sulfato de amonio), es decir indicaron presencia de bacterias nitrificantes, por otra parte en el cultivo primario C así como en el cultivo selectivo NS, los resultados fueron negativos, lo cual se atribuye que estos después de 2 o 3 días se acidifican por la presencia de ácido nítrico que inhibe la actividad nitrificante.

La falta de oxigenación en las pruebas para microorganismos nitrificantes en los cultivos NS y C pudo ser otra condición que afectó su actividad dando resultados negativos, aquí debe recordarse que el oxígeno es un factor determinante para la actividad y crecimiento de estos. Las pruebas BART no hacen referencia a necesidad de suministrar este elemento a los tubos de reacción y por tanto su aplicación a estos medios de cultivo es restringida.

Con aplicación del reactivo de Griess, es posible hacer una diferenciación bioquímica rápida de los grupos de bacterias amonio-oxidantes y nitrito oxidantes, y corroborar su presencia mediante el reconocimiento morfológico aplicando las tinciones referidas anteriormente.

Las pruebas BART, son una herramienta útil susceptible de ser aplicadas en la detección de actividad nitrificante, limitando su uso a aguas residuales donde la concentración de los compuestos como el amonio sea inferior a 3g/L que no promuevan la rápida acidificación de la muestra en el tubo de reacción e inhiban su actividad o bien se contemple la forma de neutralizar el pH de la muestra. En cuanto al suministro de oxígeno, este puede no ser un factor limitante para la actividad nitrificante, debido a que el recipiente es llenado hasta aproximadamente al 50% de su volumen de capacidad, y al cerrarlo, el aire queda atrapado al cerrar el tubo (recipiente) es suficiente para la sobrevivencia de las bacterias nitrificantes.

Las pruebas BART constituyen un medio de cultivo, que puede ser empleado en el inicio de su aislamiento para realizar estudios con mayor profundidad, relativos tanto a su morfología (taxonomía) como aspectos ecológicos en aguas residuales.

El empleo simultáneo del reactivo de Griess y las pruebas BART para bacterias nitrificantes constituyen elementos importantes para la detección bioquímica del proceso de nitrificación, siendo el reactivo de Griess el más rápido para ello. Mientras que las pruebas BART además de ser un medio de detección constituye un medio de aislamiento, a partir de aguas residuales, y un inóculo para los medios selectivos.

Sin embargo, en los medios selectivos de NS y CA, donde ocurre la acidificación las pruebas BART tienen su limitación, y es necesario tener en cuenta la necesidad de neutralizar el medio, aplicando sulfato dibásico de potasio, dentro del intervalo de cinco días establecidos por las pruebas.

Considerando que el objetivo principal del presente trabajo es el estudio de las bacterias nitrificantes presentes, y de acuerdo a los objetivos planteados, hasta el momento se ha cumplido con los de aplicación y desarrollo de diferentes técnicas encaminadas al reconocimiento de las bacteria nitrificantes a nivel de laboratorio empleando diferentes medios de cultivo, enriquecidos con sulfato de amonio (SA) y con cloruro de amonio (CA), así como empleando medios selectivos para el grupo de bacterias amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes, tal es el caso de *Nitrosomonas* y *Nitrobacterias*, respectivamente.

### V.1.5.3 Ensayos respirométricos

En el caso particular de la nitrificación mediante el consumo de oxígeno, es posible hacer una estimación de la velocidad de oxidación del sustrato amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) al producto nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) mediante la siguiente fórmula, la que permitirá calcular la disminución del amoniaco y el aumento de nitratos.

Para establecer la oxidación de amoniaco a nitrato se consideró la siguiente relación: **1 mgOD/L registrados en el respirómetro= 1/5 mg N-NH<sub>3</sub>**

#### V.1.5.3.1 Primera corrida experimental

En esta corrida se contemplo como objetivo determinar el tiempo en el cual se inicia la reacción de nitrificación, para ello se tomo como punto de partida el inicio y termina de la transformación de amoniaco a nitrato, partiendo de una concentración de 100 mg/L de sulfato de amonio.

Los resultados obtenidos indican que la reacción se inició en los primeros 15 minutos, dado que en ese de tiempo se observo en la mayoría de los matraces de prueba incrementos en cuanto al consumo de oxígeno. Posterior a éste, los valores no presentaron variaciones considerables manteniéndose constantes hasta las 96 horas.

De acuerdo con los registros de pH, se detectó que a diferencia de los medios de cultivo utilizados en el aislamiento y reconocimiento de bacterias nitrificantes, este no varió y se mantuvo constante en 7.8 unidades, lo cual podría interpretarse como un indicativo de que la reacción nitrificante, que tuvo lugar en los matraces, se efectuó a una baja velocidad

Con el propósito de constatar que la transformación de amoniaco se había realizado, se extrajo de cada uno de los matraces una muestra aplicándose el reactivo de Griess, que como es sabido, permite observar una coloración rosa-

púrpura en presencia de nitrito, indicando cualitativamente que dicha transformación tuvo lugar. En este caso particular en todos los matraces del experimento se observó la coloración referida, corroborándose de forma cualitativa la actividad nitritante

### V.1.5.3.2 Segunda corrida experimental

Los resultados obtenidos del consumo de oxígeno registrado durante 96 horas de experimentación, denotan que al igual que en la corrida experimental 1, la reacción se inicia en la primera media hora después de haber puesto a los microorganismos con el sustrato. Asimismo, se aprecia poca variación en los valores del oxígeno consumido dentro de las primeras 48 horas. No obstante, al alcanzar las 72 horas de experimentación, se observa un incremento máximo que se mantiene constante hasta las 96 horas (Tabla 7).

Al igual que en la primera corrida, se constató la presencia de nitritos mediante la adición del reactivo de Griess en las muestras extraídas de los matraces.

Para medir la cantidad de amoníaco transformado se empleó la técnica de Nessler, la cual es una prueba colorimétrica. Es importante mencionar que el intervalo de concentración que se maneja es de 0 a 3 mg NH<sub>3</sub>/L, por lo que concentraciones superiores requieren de diluciones para poder cuantificar los mg NH<sub>3</sub>/L de amoníaco sin transformar.

Tabla 7. Valores obtenidos de la concentración de amoníaco y nitrato durante el lapso de 96 horas, empleando 100mg/L de cloruro de amonio

| Concentración (mg/L) | Matraz <sup>a</sup> |          |           |            |            |
|----------------------|---------------------|----------|-----------|------------|------------|
|                      | Testigo             | 1 (24 h) | 2 (48 h)  | 3 (72 h)   | 4 (96h)    |
| N-NH <sub>3</sub>    | 0.00                | 100.00   | 2.01±0.33 | 2.01±0.56  | 3.01±0.44  |
| N-NO <sub>3</sub>    | 0.00                | 0.00     | 12.7±0.51 | 13.01±0.25 | 13.81±0.67 |

*Nota: <sup>a</sup> cada uno de los matraces evaluados fue retirado completamente del experimento y corresponde al tiempo en el cual se realizó la determinación del contenido de amoníaco y nitrato.*

A partir de los datos obtenidos se puede decir que de los 100mg de cloruro de amonio, los matraces 2, 3 y 4 registraron entre el 97 y 98 mg NH<sub>3</sub>/L transformado a nitrito y nitrato y solo 13.81mg NH<sub>3</sub>/L fue transformado al producto final de la reacción. Sin embargo, considerando que como nitrato se obtuvieron lecturas en los matraces 2, 3 y 4 entre 11 y 12 mg/L, siendo estos datos inferiores a la concentración de nitrato que esperaría formarse, aproximadamente 100 mgNO<sub>3</sub>/L, se deduce que el proceso de conversión final al producto, pudo verse inhibido por la presencia de nitritos (tabla 7).

Adicionalmente, en la cuantificación de los nitratos se utilizaron bandas específicas (Nitrate Test), de la casa Merck, estas permiten medir su concentración en un intervalo de 0 a 500 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Una característica es que

también permiten la detección de nitritos que pudieran estar interfiriendo con la medición. En el caso particular dado los mg de amoníaco transformado fueron de aproximadamente 96 mg/L, se esperaba encontrar una concentración cercana de nitratos, lo cual no ocurrió, lo que hace presuponer que la acumulación de nitritos causó la inhibición de las bacterias nitrificantes.

Por otro lado, si se tiene en cuenta la relación estequiométrica, la cual requiere de 5.7 mg/L de oxígeno para oxidar 1mg/L de amoníaco, los valores de oxígeno consumido indicarían que se transformaron entre 4 y 5 mg NH<sub>3</sub>/L (tabla 7), siendo estos valores menores y no coherentes con los datos obtenidos a partir de la medición de amoníaco oxidado (tablas 7 y 8), debido a que las mediciones, empleando las técnicas específicas para estos, indican 96 mg NH<sub>3</sub>/L transformado.

Tabla 8. Concentración de amoníaco removido y transformado a nitrato utilizado una concentración inicial de 100 mg N-H<sub>3</sub>/L durante 96 horas.

| Matraz | Tiempo (Horas) | N-NH <sub>3</sub> (mg/L) | N-NH <sub>3</sub> Transformado (mg/L) | N-NO <sub>3</sub> Generado (mg/L) |
|--------|----------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 1      | 24             | 100.0                    | 0                                     | 0.0                               |
| 2      | 48             | 3.01±0.61                | 96.9±0.82                             | 10.81±1.0                         |
| 3      | 72             | 2.01±0.43                | 97.9±0.37                             | 10.07±0.92                        |
| 4      | 96             | 2.01±0.70                | 97.9±0.51                             | 10.01±0.75                        |

Adicionalmente, se realizaron observaciones al microscopio de la biomasa provenientes de los matraces. La aplicación de azul de metileno permito la observación de ambos tipos de bacterias (nitritantes y nitratantes), siendo cualitativamente más numerosas las primeras, lo cual se considera que es otro de los motivos que contribuyó a que la reacción fuera lenta, y que se marcará significativamente la inhibición por nitritos.

#### V.1.5.3.3 Tercera corrida experimental

En el tercer experimento se trabajo con una concentración de 10mg/l de cloruro de amonio, considerando que a esta concentración la inhibición por productos intermedios (ácido nítrico y nitrito) es menor. La temperatura se fijó en 25°C y pH de 8 unidades y un tiempo de una semana.

Cuantificando la concentración de amoníaco, se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 9. En este caso, se realizó una dilución de 1:25, para estar dentro del intervalo de concentración apropiado para la aplicación de la técnica.

Tabla 9. Valores promedio de amoniaco transformado a nitrato empleando una concentración inicial de 10 mg/L de cloruro de amonio.

| Matraz | Tiempo (Horas) | N-NH <sub>3</sub> (mg/L) | N-NH <sub>3</sub> transformado (mg/L) | N-NO <sub>3</sub> generado (mg/L) |
|--------|----------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 1      | 24             | 2.6±0.92                 | 8.0±0.14                              | 7.1±0.14                          |
| 2      | 48             | 2.4±0.5                  | 8.2±0.35                              | 8.0±0.35                          |
| 3      | 72             | 1.7±0.28                 | 8.3±0.07                              | 8.1±0.5                           |
| 4      | 96             | 0.6±0.21                 | 8.9±0.3                               | 8.4±0.28                          |

Haciendo la relación de oxígeno consumido con la determinación de la concentración de amoniaco, se puede decir que los mg de N-NH<sub>3</sub> transformados, al igual que la anterior corrida no corresponden con las determinaciones analíticas de N-NH<sub>3</sub> y N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, siendo estas últimas mayores e indicando que después de 96 horas es posible transformar más del 90% del sustrato (N-NH<sub>3</sub>) a los productos (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

Al igual que en los experimentos anteriores, se observó por la adición del reactivo de Griess, la presencia de nitritos, que de acuerdo a Sharma y Ahlert (1977) pueden ocasionar inhibición en concentraciones aún menores de los 10mg/L, lo cual pudo haber ocurrido en la presente investigación.

En relación a las bacterias nitrificantes encontradas en los matraces, se pudo diferenciar del experimento anterior, la presencia de éstas en forma de agregados esféricos bien formados y de manera cualitativa más abundantes. Esta condición permitió inferir que las condiciones experimentales fijadas en este último experimento son más favorables para el desarrollo de las bacterias nitrificantes.

#### V.1.5.4 Cuantificación de bacterias nitrificantes

En la tabla 10 se muestran los resultados de la cantidad de agregados establecidos en el inóculo inicial y después de 96 horas de incubación en dos de los ensayos respirométricos.

Tabla 10. Número de bacterias nitrificantes encontradas a diferentes concentraciones empleando el respirómetro.

| Corrida experimental | CD inicial (núm. Agregados/0.1mL) | CD final (núm. agregados/0.1mL) |
|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1                    | ND                                | ND                              |
| 2                    | 178±11                            | 186±15                          |
| 3                    | 235±21                            | 289±13                          |

Nota: CD = cuenta directa; ND = No determinado

En el caso de la primera corrida experimental, no se realizó la cuenta de las bacterias nitrificantes, debido a que se estableció como objetivo principal la estimación del tiempo de reacción.

En el caso de la 2ª corrida en la que se empleó una concentración inicial de 100 mg/ L de amonio, se tiene que el incremento de agregados corresponde a 8 / 0.1 mL; en tanto que en la 3ª corrida en la que la concentración inicial de amonio fue de 10 mg/ L, el incremento fue de 54 agregados/ 0.1 mL. Lo que indica que el aumento de agregados estuvo influenciado por la concentración de amoníaco, lo que confirma que el sustrato (amoníaco en concentraciones cercanas a 100 mg/ L puede ser inhibidor de la actividad nitrificante, aún en medios específicos para estas bacterias

#### V.1.5.5 RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AMONIO-NITRATO Y BACTERIAS NITRIFICANTES

Para establecer una relación de amoníaco transformado a nitrato y bacterias nitrificantes, se consideró el tiempo que tarda en transformarse el amoníaco al nitrato, así como el número de bacterias nitrificantes que intervienen.

Partiendo de los datos de la figura 21 y tabla 9, donde se muestran los valores obtenidos en la experimentación con el respirómetro durante un período de 96 horas y una concentración de 10 mg/L de cloruro de amonio, en estos se observa que después de 24 horas, se encuentran 2.6 mg NH<sub>3</sub>/L sin transformar, lo cual indica una conversión del 70% de sustrato al producto (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y se refleja en los 7.1 mg N-NO<sub>3</sub>/L generados, registrados en ese tiempo. En este sentido, puede decirse que, después de las primeras 24 horas, la transformación del amonio remanente se realiza más lentamente a causa del agotamiento del sustrato (amonio), el cual es indispensable para que las *Nitrosomonas* generen el nitrito empleado por las *Nitrobacterias*, durante el proceso de nitrificación.

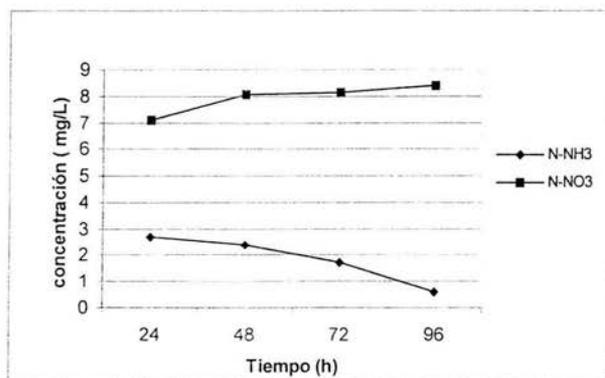


Figura 21.- Perfil de transformación de amoníaco a nitrato a lo largo del tiempo

En cuanto al número de agregados bacterianos cuantificados al microscopio como nitrificantes (tabla 10), para el caso de la corrida experimental 3, se encontraron 235 agregados/0.1mL al inicio del experimento, en tanto que al final del mismo, la cuenta ascendió a 289 agregados/0.1mL. Lo anterior indica que ocurrió únicamente un incremento del 18% de los agregados iniciales. Cabe recordar que el tiempo de reproducción de las *Nitrosomonas* se encuentra dentro de intervalo de 8 a 36 h, en tanto que en el caso de las *Nitrobacterias*, es de 12 a 59 h. Para generar una nueva célula (tiempo relativamente largo), siempre y cuando las condiciones fisicoquímicas le sean favorables, es decir sin que ocurra acumulación de subproductos de la nitrificación que puedan interferir con su metabolismo y consecuente duplicación.

Considerando lo anterior, puede afirmarse que bajo las condiciones experimentales establecidas, el detectar el incremento en la presencia de agregados nitrificantes a un valor de 2350 agregados por mililitro, está asociado con el 70% de transformación del amoníaco presente a una concentración de 10 mg/L, en un período de 24 horas, a 20°C, en ausencia de luz, bajo oxigenación y agitación constante.

Adicionalmente, en la tabla 8 y 10, se observan los valores de la concentración de 100 mg/L de amoníaco y con un número inicial de 178 de agregados contenidos en 0.1mL, la transformación alcanza a ser aproximadamente del 98%, después de 48 horas. Teniendo en cuenta estos últimos datos, se esperaría encontrar un porcentaje de nitrato formado semejante, sin embargo, esto no ocurrió así debido a que a las 48 horas se encontró 12.7mg N-NO<sub>3</sub>/L. Lo anterior indica que no todo el amoníaco transformado ha pasado a ser nitrato. Asimismo, considerando que en la transformación se generan otros subproductos como nitrito y ácido nítrico, entre otros, es posible que estos compuestos resultaran inhibitorios para la actividad de las bacterias involucradas en la segunda etapa de la nitrificación, es decir para las nitrobacterias.

## V. 1. 6 CONCLUSIONES PARCIALES

- Los agregados se encuentran formados por un número variable de bacterias.
- Adicionalmente, es necesario considerar que el encontrar agregados de bacterias nitrificantes en las muestras analizadas, no implica que necesariamente se encuentren activas bajo condiciones ambientales prevalecientes.
- Las observaciones al microscopio de contraste no permiten una fácil diferenciación entre agregados nitrificantes y nitrificantes, por lo que para esta primera etapa experimental se optó por realizar la cuenta total de estos y corroborar su presencia y actividad mediante la medición de la concentración de amoníaco y nitrato, así como por la aplicación de las pruebas de reconocimiento bioquímico anteriormente señaladas.

## V.2 RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

### V.2.1 SEGUIMIENTO DE LA NITRIFICACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS.

Considerando que con los resultados obtenidos con el respirómetro automático, no se logró obtener una correspondencia entre el consumo de oxígeno y la concentración de amoníaco transformado, se optó por hacer la estimación de la velocidad nitrificante en dos reactores uno cerrado y uno aireado.

#### V.2.1.1 Comparación de la nitrificación en cultivos sin airear y cultivos aireados

En las tabla 11 y 12 y figuras 22 y 23 se observa que tanto en el cultivo sin suministro de aire (CSA), como en el cultivo con aireación (CCA) el proceso de transformación del sustrato se inició en los primeros 30 minutos, tal y como se había observado en las corridas con el respirómetro. En el primer caso a este tiempo se transformaron 2.3 mg N-NH<sub>3</sub>/ L, lo que corresponde aproximadamente al 10 % del amoníaco inicialmente adicionado, en tanto que en el cultivo con oxigenación continua, el amoníaco transformado corresponde a 4.8 mg N-NH<sub>3</sub>/ L o 17 %, lo que indica que en condiciones de suministro de aire constante la reacción es más rápida. No obstante, a las 24 horas tanto en el CSA, como en el CCA, se detectó una transformación elevada, ya que la cantidad de sustrato residual fue de 21.5 y 20.8 % respectivamente, lo que indica que las cantidades de amoníaco transformado corresponden a 78.5 y 79.2 % respectivamente. Sin embargo en el CSA (tabla 11 y figura 22) la generación de nitratos no corresponde a la esperada ya que de los 18.8 mg/ L de amoníaco transformado en la primera etapa de la nitrificación (nitritación) en un periodo de 24 horas, sólo se generaron 9.0 mg/ L de nitrato en la segunda fase (nitratación) lo que corresponde al 37 % de amoníaco transformado al producto final.

Tabla 11. Resultados obtenidos de la actividad nitrificante en un cultivo cerrado (sin aporte de aire).

| Tiempo (horas) | N-NH <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L) | N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L) | pH (Unidades) |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------|
| 0.0            | 23.95±0.07                            | 0.00                                  | 7.6±0.07      |
| 0.5            | 21.75±1.06                            | 2.15±0.35                             | 7.5±0.04      |
| 1.0            | 14.95±0.78                            | 5.9±0.57                              | 7.6±0.07      |
| 2.5            | 10.85±0.49                            | 7.0±0.71                              | 7.5±0.04      |
| 3.0            | 10.90±.42                             | 7.75±0.78                             | 7.5±0.02      |
| 3.5            | 8.75±0.21                             | 8.3±0.57                              | 7.6±0.07      |
| 4.0            | 7.3±0.71                              | 8.65±0.78                             | 7.6±0.14      |
| 24.0           | 5.15±0.64                             | 9.0±0.99                              | 7.6±0.14      |

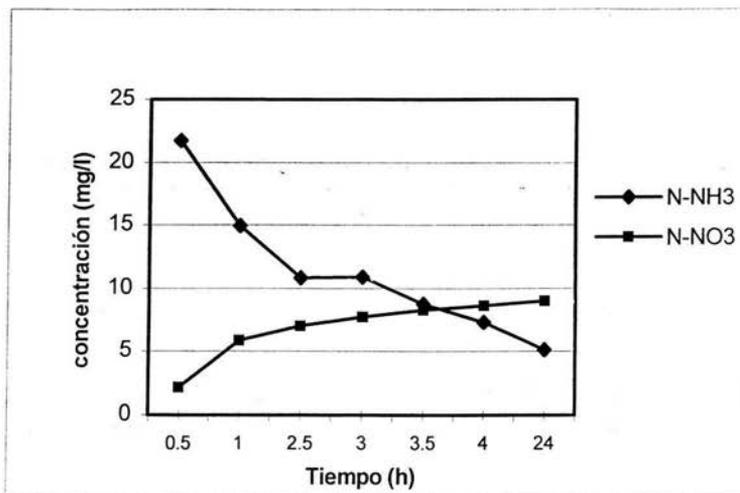


Figura 22.- Velocidad de nitrificación en un cultivo cerrado sin suministro de aire

En la tabla 12 y figura 23 se presentan los resultados del reactor aireado, en esta se observa que el proceso de nitrificación fue más eficiente. La transformación de amoníaco es ligeramente superior con respecto al reactor cerrado, y aún cuando la cantidad de amoníaco transformado (19 mg/ L) no corresponde a la cantidad del producto final (17 mg/ L de nitrato), la cantidad que se registró de este, fue más elevada que en el reactor cerrado.

Tabla 12.- Datos obtenidos de la transformación de amoníaco bajo oxigenación constante en un cultivo cerrado

| Tiempo (horas) | N-NH <sub>3</sub> (mg/L) | N-NO <sub>3</sub> (mg/L) | pH (unidades) |
|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| 0              | 24.0±0.1                 | 0                        | 7.5±0.01      |
| 0.5            | 19.15±0.9                | 5.0±0.6                  | 6.7±0.6       |
| 1.0            | 14.5±0.9                 | 5.6±0.5                  | 6.3±0.4       |
| 2.5            | 11.9±0.8                 | 7.5±0.5                  | 6.0±0.3       |
| 3.0            | 9.1±0.4                  | 9.8±0.6                  | 5.8±0.2       |
| 3.5            | 8.9±0.5                  | 11.7±0.9                 | 5.6±0.1       |
| 4.0            | 5.7±0.3                  | 15.8±1.4                 | 5.5±0.2       |
| 24.0           | 5.0±0.1                  | 17.6±0.7                 | 5.5±0.2       |

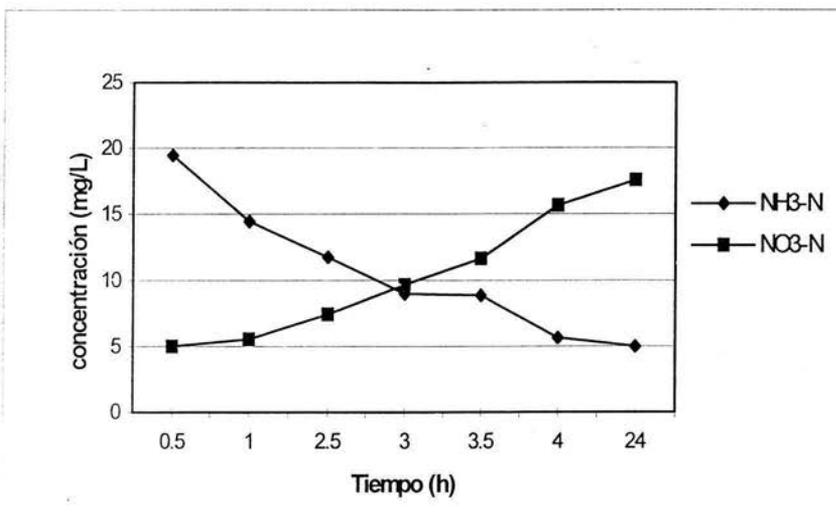


Figura 23.- Velocidad de nitrificación en cultivo cerrado con suministro de aire

Se reporta que las bacterias nitrificantes son aerobias facultativas y pueden encontrarse activas en condiciones menores a 2,0 mg/ L (Prosser, 1992), los resultados obtenidos indican que la nitrificación se llevó a cabo eficientemente en las dos condiciones ensayadas, en tanto que la nitrificación fue fuertemente afectada por la concentración de oxígeno. En este sentido se tiene que las mediciones de oxígeno disuelto (OD) indican que en ambos casos los cultivos se desarrollaron en condiciones aerobias, en el CSA, aún sin haber adicionado oxígeno la concentración de OD fue de 2.9 mg/ L, la que es menor a los 5.0 mg/ L que se adicionaron en el CCA, lo que favoreció la segunda etapa del proceso de nitrificación e impidió la acumulación de nitritos, que es otro factor que inhibe a las bacterias nitrificantes, lo que coincide con lo reportado por Beccari et al., (1992), Hanaki et al., (1990) y Munich et al., (1996) quienes indican que la acumulación de nitritos y otros productos intermedios inhiben a las bacterias nitrificantes, lo que condujo a la diferencia en la generación de nitrato registrada en los CSA y CCA.

En cuanto al pH, este se mantuvo constante en el reactor cerrado, en tanto que en el aireado se registró un decremento, por lo que se decidió agregar un amortiguador (fosfato dibásico) para mantener el valor óptimo para la nitrificación, no obstante, los valores de pH continuaron descendiendo lo que se atribuye a la formación de ácido nítrico. En este sentido se tiene que la acidificación es considerada como otro indicador de la transformación en estudio (Anthonisen, 1976; Klotar et al., 1996)

Al igual que en los experimentos respirométricos, se aplicó el reactivo de Griess y en ambos casos se pudo detectar la presencia de nitritos. Cabe mencionar que en el primer reactor, la coloración rosa púrpura fue más intensa que en el

segundo, lo que se relaciona con la mayor actividad nitrosante detectada en el cultivo aireado lo que disminuyó la acumulación de nitritos.

### V.2.1.2 CUANTIFICACIÓN DE AGREGADOS Y UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) DE BACTERIAS NITRIFICANTES

Los resultados de la cuenta de bacterias nitrificantes por los métodos microscópico y de siembra en placa se presentan en la tabla 13 en esta se observa que en el caso del cultivo sin suministro de aire CSA se registró un aumento de 74 agregados / 0.1 mL, en tanto que en el cultivo aireado (CCA) el aumento fue de 85 agregados / mL. Por otro lado las UFC registradas en placa permitieron detectar un comportamiento semejante a los resultados obtenidos a partir de las cuentas directas de los agregados. Es decir el aumento fue menor en las muestras extraídas de CSA (16 UFC/ mL) que en las extraídas de CCA (73 UFC/ mL). El incremento registrado por ambos métodos indica que la cantidad de sustrato empleado favoreció el crecimiento y multiplicación bacteriana y que como era de esperarse este fue mayor en los cultivos con mayor concentración de oxígeno, ya que las condiciones aerobias promueven la actividad metabólica y consecuentemente el crecimiento y reproducción bacteriana.

Tabla 13.- Cuantificación del número de bacterias encontradas en los reactores.

| Cultivo | CD inicial<br>(núm. Agregados/0.1mL) | CD final<br>(núm. Agregados/0.1mL) | CP inicial<br>(UFC/0.1mL) | CP final<br>(UFC/0.1mL) |
|---------|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| CSA     | 130±21                               | 204±8                              | 73±4                      | 89±8                    |
| CCA     | 153±10                               | 238±18                             | 104±11                    | 177±11                  |

Nota: CD = cuenta directa, CP = cuenta en placa

Por otra parte los valores obtenidos a partir de la aplicación de la cuenta en placa fueron menores a los obtenidos por la cuenta directa de agregados, lo cual es lógico si se considera que en la primera únicamente se cuantifican a las bacterias viables, en tanto que en los métodos microscópicos se detectan vivas y muertas. Y aún cuando los agregados están formados por un número variable de bacterias, las UFC no corresponden a los agregados ni tampoco a las bacterias aisladas observadas microscópicamente. Así mismo es conveniente aclarar que este tipo de bacterias, crecen mejor en medio líquidos en tanto que en los sólidos su desarrollo es más lento o nulo.

La razón por la cual ocurre esto no es muy clara, sin embargo se deduce que puede deberse a la disponibilidad del sustrato y la transferencia del oxígeno.

### V.2.3 APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE NITRIFICACIÓN EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA

Es conveniente aclarar que el estudio se realizó en la etapa media de la época de lluvias, en la que la planta se encuentra operando de manera estable y que el muestreo del sistema de lodos activados se hizo una vez por semana durante 3 semanas continuas, y que mediante la aplicación de las pruebas de BART, el reactivo de Griess, así como, la observación al microscopio se evidenció la actividad nitrificante en este tipo de muestras.

La aplicación de las pruebas BART, reactivo de Griess, así como la observación al microscopio de la biomasa contenida en aguas residuales domésticas, provenientes de la PTARCU, permitió evidenciar la existencia de actividad nitrificante.

Tabla 14. Detección de actividad nitrificante en aguas residuales domésticas de la planta de tratamiento de C. U.

| Parámetro                                       | Semana 1  | Semana 2 | Semana 3 |
|---|-----------|----------|----------|
| Oxígeno disuelto (mg/L)                         | 3.3±0.2   | 3.4±0.2  | 3.5±0.4  |
| Ph (unidades)                                   | 7.1±0.1   | 7.1±0.14 | 7.4±0.14 |
| DQO (mg O <sub>2</sub> /L)                      | 230±14    | 351±15   | 295±21   |
| Temperatura (°C)                                | 20.0±1.4  | 18±1.41  | 17±0.7   |
| Amoniaco (mg N-NH <sub>3</sub> /L)              | 12.0±1.41 | 10±1.41  | 11±2.3   |
| Nitratos (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L) | 5.4±0.9   | 5.5±0.4  | 4.9±1.1  |
| Relación C:N                                    | 13:1      | 22:1     | 18:1     |
| *Núm. de BN:                                    |           |          |          |
| CD (agregados/0.1mL)                            | 35±21     | 36±5     | 55±3     |
| CP (UFC/0.1MI)                                  | 103±10    | 115±14   | 108±8    |

\*Núm. de BN = número de bacterias nitrificantes; CD = cuenta directa; CP = cuenta en placa

Analizando los datos de la tabla 14, se puede afirmar que las condiciones de temperatura, oxígeno disuelto, pH y la relación carbono:nitrógeno (C:N), no son las ideales para el desarrollo de las bacterias nitrificantes, por lo que su proliferación se ve limitada. Sin embargo, aunque en baja proporción, se encuentran tróficamente activas en ese tipo de aguas residuales.

Aplicando el reactivo de Griess, dicho resultado también fue positivo dado que a muestras a las que se les adicionó mostraron la coloración rosa-púrpura que evidencia la presencia de nitritos, producto intermedio en el proceso de nitrificación. Las pruebas BART, para evidenciar actividad nitrificante también resultaron positivas, lo cual confirma la presencia de actividad nitrificante.

La cuantificación, por los dos métodos, permite afirmar que las bacterias nitrificantes existentes en el agua residual, pueden desempeñar una actividad significativa dentro del sistema de lodos activados, si sus condiciones de operación son modificadas de manera adecuada, principalmente en lo concerniente a pH, temperatura y oxígeno disuelto. Así, por ejemplo, un incremento en el tiempo de residencia hidráulica y celular, redundaría en una remoción de compuestos de carbono, promoviendo el establecimiento de la relación 5:1 de nitrógeno:carbono que se requiere para que en un sistema de tratamiento de aguas residuales, tenga lugar de manera más eficiente el proceso de nitrificación.

#### V.2. 4 Conclusiones parciales

Con base a los resultados obtenidos, como estrategia de trabajo para la detección de la actividad nitrificante en una muestra de agua residual determinada se puede recomendar el empleo de la siguiente secuencia:

- 1.- Aplicación del reactivo de Griess para detectar presencia de amonio, nitrito y nitratos.
- 2.- En caso de ser positivos los resultados con el reactivo, emplear las pruebas BART a fin de detectar la presencia de bacterias nitrificantes.
- 3.- Realizar de manera simultánea observaciones al microscopio, a fin de diferenciar por morfología a las bacterias nitrificantes, aplicando la tinción con azul de metileno "in vivo", además de elaborar preparaciones permanentes con las técnicas de Gram, Neisser y corpúsculos metacromáticos.
- 4.- Para diferenciar entre las *Nitrosomonas* y *Nitrobacterias*, se puede aplicar la tinción de sudan negro, la cual es positiva para el segundo, dejando de manifiesto gránulos de reserva tipo PHB, cuando son sometidas a condiciones anaerobias.
- 5.- En caso de requerir determinar con exactitud la especie de bacterias nitrificantes involucradas en el proceso, elaborar medios selectivos (específicos) para la especie buscada.
- 6.- Recurrir a las técnicas de microscopía electrónica, para realizar una caracterización morfológica con mayor detalle.
- 7.- El uso de digitalización de imágenes y análisis de las mismas empleando un software, permitiría efectuar un diagnóstico de la actividad nitrificante de manera más rápida, toda vez que se cuente con el equipo y el personal entrenado en su manejo y tenga conocimientos acerca de la morfología y fisiología de las bacterias nitrificantes.

## VI CONCLUSIONES GENERALES

Basados en literatura especializada, se establecieron los parámetros fisicoquímicos y de operación óptimos para el fenómeno de nitrificación, el cual se estudió en un reactor a escala de laboratorio operado bajo condiciones controladas.

Los resultados obtenidos permitieron realizar el reconocimiento morfológico y bioquímico de bacterias nitrificantes. Las técnicas empleadas, como son las tinciones de Gram, Neisser, corpúsculos metacromáticos y azul de metileno, permitieron el reconocimiento rápido de este tipo de microorganismos

En particular, las tinciones empleando sudan negro, permitió destacar gránulos de PHB, de polifosfatos, respectivamente, lo que permiten diferenciar visualmente entre bacterias del tipo *Nitrosomonas* de las *Nitrobacterias*.

En cuanto a la actividad nitrificante, mediante la aplicación del reactivo de Griess, se logró detectar, cualitativamente, la presencia de nitrito indicando a la vez que las bacterias nitrificantes se encontraban tróficamente activas. Lo cual se constató tanto en las observaciones y análisis realizados en los cultivos CSA y CCA, como en los cultivos selectivos (NS y NB) y en cultivos de enriquecimiento, cuyo medio inicial fue agua residual de tipo doméstico y sulfato de amonio.

Las pruebas BART, también constituyen otro elemento que puede contribuir a la detección de bacterias nitrificantes en una muestra problema. Su empleo permite determinar su presencia cuando se encuentran metabólicamente activas. Su desventaja es que no permite cuantificar a esos microorganismos y que además una concentración de amonio superior a 3 g N-NH<sub>3</sub>/L, puede interferir con los resultados obtenidos. En el caso de las aguas residuales este tipo de pruebas también pueden ser empleadas como una herramienta para el monitoreo relacionado con la transformación de amoniaco a nitrato.

En cuanto a las técnicas de cuenta de las bacterias nitrificantes, la cuenta directa resulta ser la más práctica debido a que permite observar a las bacterias nitrificantes tanto en forma metabólicamente activa como de manera inactivas, sobre todo cuando se encuentran formando agregados.

Cabe mencionar que el cultivo y aislamiento de las bacterias nitrificantes (*Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradsky*), es sumamente laborioso y lleva mucho tiempo obtener resultados favorables, por lo que la utilización de técnicas de reconocimiento de actividad fisiológica son una mejor alternativa, en la revisión periódica de la transformación de amoniaco a nitrato en un planta de tratamiento de aguas residuales, y son de importancia cuando esta misma tiene limitaciones en cuanto a la infraestructura y equipo especializado necesario en el análisis de dichos compuestos del nitrógeno, que permita optimizar la operación del sistema de tratamiento, en cuanto al fenómeno de nitrificación se refiere.

La aplicación de las técnicas empleadas en la realización del presente trabajo permitieron reconocer rápidamente la actividad, en un sistema de aguas residuales tal como se hizo en la PTARCU, la cual se encuentra trabajando prácticamente todo año.

Finalmente ,debe señalarse que los indicadores biológicos, en este caso la presencia y actividad de bacterias nitrificantes, deben ser respaldados mediante análisis fisicoquímicos que le den mayor sustento a su empleo como herramienta rápida y directa de monitoreo en un sistema depurador de aguas residuales.

## VI LITERATURA CONSULTADA

- Anthonisen A. C., Loerh R. C., Prakasam T. B. y Srinath E. G. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF*. **48**(5):835-852.
- APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association Washington D. C. EE.UU.A. 1134 pp.
- Beccari M., Di-Pinto M. A. C., Ramadori R. y Tomey M. C. 1992. Effects of dissolved oxygen and diffusion resistance on nitrification kinetics. *Wat. Res.* **26**(8):1099-1104.
- Bock E., Hoops H. P., y Harms H. 1989. Introduction. En: Autotrophic Bacteria. Schlegel H. G. and Bowien B. (Eds). Brock/Springer Series in contemporary Bioscience Fems. Springer-Verlag. 81-95.
- Bortone C., Cech J., Germmirtl F., Bianchi R y Tilche J. 1994. Experimental approaches for the characterization of a nitrification/denitrification process on industrial wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **29**(7):129-136.
- Brock T. D. y Schlegel H. G. 1989. Introduction. En: Autotrophic Bacteria. Schlegel H.G. and Bowien B. (Eds). Brock/Springer Series in contemporary Bioscience Fems. Springer-Verlag. 1-15.
- Burrell P. C., Keller J., y Blackall LI. 1998. Microbiology of a nitrite oxidizing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (5):1878-1883.
- Cardot C. 1999. Génie de l'environnement les traitements de l'eau. Procédés physico-chimiques et biologiques. Cours et problèmes résolus. Ellipses. Ed. Marketing S. A. Paris, Francia. 248 pp.
- Çelik S. M., Özdemir B., Truan M., Koyuncu, I., Atesok, G. y Sarikaya, Z. H. 2001. Removal of ammonia by natural clay minerals using fixed and fluids bed columns reactor. *Wat. Sci. Tech: Water Supply*. **1**(1): 91-88.
- CNA. 2002. Ley Federal de Derechos en Materia de agua. Ed. Comisión Nacional del Agua. México D. F. 113 pp.
- De-A-Cybys L. F. y Horan N. J. 1997. Protozoan and metazoan populations in sequence batch reactors operated for nitrification and/or denitrification. *Wat. Sci. Tech.* **3**(1):81-86.
- DOF. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación, 06 de enero de 1997.

- Drtil M., Németh P. y Bodík I. 1993. Kinetic constants of nitrification. *Wat. Res.* **27**(1):35-39.
- Eckenfelder W. W. y Argaman Y. 1991. Principles and physical/chemical nitrogen removal. En: Phosphorous and nitrogen from wastewater: principles and practice. Richard I Sedlack (Eds). Lewis Publishers. EEUUA. 3-42.
- Geiseke A., Purkhold U., Waner M., Amman R. y Schramm A. 2001. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(3): 1351-1362
- Gerhardt P., Murray R. G. E.; Willis A., Wood A., Noel R. y Krieg M. 1994. Methods of general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. EEUUA. 623-624.
- Gernaey K., Vanrolleghem P., y Verstrete W., 1998. On-line estimation of Nitrosomonas kinetic parameters in activated sludge using titration in-sensor-experiments. *Wat. Res.* **32**(1):71-80.
- Gray N. F. 1989. Biology of wastewater treatment. Oxford Science Publication, Great Britain. 725 pp.
- Hach Company. 1995. Biological Activity Test-BART Manual. EEUUA. 25pp
- Hanaki K., Wantawin Ch. y Ohgaki S. 1990. Effects of the activity of heterotrophos on nitrification in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**(3):289-296
- HanaKi K., Wantawin Ch. y Ohgaki S. 1990a. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**(3):297-302.
- Holben W. E., Kazuhiko N. S., Sumino T. y Suwa Y. 1998. Molecular analysis of bacteria communities in a three-compartment granular activated sludge systems. Indicates community-level control by incompatible nitrification processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **4** (7): 2528-2532
- Holt J. 1999. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol. 3. Baltimore, Maryland. 1808-1034.
- Hommel N. G., Russell S. A., Bottomley P. J., y Arp D. J. 1998. Effects of soil on ammonia, ethylene, chloroethane oxidation and 1,1,1, trichloroethane by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (4):1372-1378.
- Hooper A. B y DiSpirito A. A. 1985 In bacteria wich grow on simple reductans, generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. *Microbial Reviews.* **49**:140-157.

- Hutts Ch., Knudsen J., Guy R., Michael J., Maloney Y., Stetzenbach L. y Walter M. 1997. Manual of environmental microbiology. American Society for Microbiology. EEUUA. 334-339 pp.
- Klotar E., Tartakovsky B. Artaman Y. y Sheintouch M. 1996. The nature of interaction between immobilized nitrification and denitrification bacteria. *Journal of Bacteriology*. 51:251-258.
- Kowalchuck O. A. y Stephen J. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria and model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55:485-529.
- Le-Bihan Y. 1995. Establissement de la nitrification. INSA. Toulouse, Francia. 30-20.
- Margulis L. y Schuartz K V. 1981. Cinco Reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la tierra. Labor. Barcelona, España. 137pp.
- Metcalf y Eddy. 1990. Wastewater engineering (Treatment and dispose). 3a Ed. McGraw-Hill. International Edition Singapore.
- Montuelle B., Voalt B., Torio-Fernández M., y Navarro E. 1996. Changes in Nitrobacter serotypes biodiversity in a river: impact of a wastewater treatment plant discharge. *Wat. Sci.* 30(5):1057-1064.
- Münch E. V., Lant P. y Keller J. 1996. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale batch reactors. *Wat. Res.* 40(2):277-284.
- Okabe S., Satoht H. y Watanabe Y. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrode. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4): 3182-3191
- Olsen G. J. y Wose C. R. 1993. Ribosomal ARN: a key phylogeny. *FASEB. Journal.* 7:113-123.
- Oremland R. S. y Capone D. G. 1988. Use of "specific" inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. En: *Advances in Microbial Ecology*. Marshall K. C. (Eds.). Plenum Press, New York. 285-383.
- Persson F., Torsten, W., Sörensson F. y Malte H. 2002 Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter. *Wat. Res.* 36: 439-1448
- Prescott L. M., Harley J. P., y Klen D. A. 1999. Microbiología. 4a Ed. McGraw-Hill Interamericana. EEUUA.
- Prioult J., Kowalck G. A., Naoumenke Z., Perikx P. J. L., Fleske J. R. y Akhpchenko I. A. 2002. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of  $\beta$  subdivision of the Class Proteobacteria in compost and composed material. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5):2216-2219.

- Prosser J. J. 1992. Mathematical modeling of nitrification process. *Advances in Microbial Ecology*. 11:263-301.
- Prosser J. L. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**: 125-177.
- Purkhold U., Pommerening-Röser A., Jurestchko S., Smmid M. C., Koops H. P. y Wagner M. 2000. Phylogenetic of all recognized species of ammonia oxide based on comparative 16s-RNA and *amo-A* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (12):5368-5368.
- Randall C. W., Pattarkine V. M. y McIlntock W. 1992. Nitrification kinetics in single sludge biological nutrient removal activate sludge. *Wat. Sci. Tech.* **25**(6):195-214.
- Ronald M. A. 1993. Hand book of microbial Media. Press. Inc. EEUUA. 1076 pp.
- Schade M. y Lemmer H. 1994. Counting bacteria of selected metabolic groups in activated sludge-an assessment of methods. *Wat. Sci. Tech.* **7**(29):75-59.
- Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E. y Margesin R. 1995. *Methods in Soil Biology*. Ed. Springer-Verlay. Berlin Alemania. 21-36.
- Schramm A., De-Beer D., Van-Den Heuvel J. C., Ottengraf S. y Amann R. 1999. Microscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by In Situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(8):3690-3696.
- Sedlack R. I. 1991. Introduction. En: Phosphorous and nitrogen from wastewater: principles and practice. Richard I Sedlack (Eds). Lewis Publishers. EEUUA.1-2.
- Seyfried F. C., Hippen A., Helmer C., Kunst S. y Rosenwinkel K-H. 2001. *Wat Sci Tech: Water Supply.* **1**(1): 71-80.
- Sharma B. y Ahlert R. C. 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Wat. Res.* **11**:897-925.
- Stanley W. W. y Mandley M. 1971. Comparison of morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *Journal of Bacteriology.* **107**(2): 563-569
- Stanley W., Frederica W.V. y Waterbury J. B. 1981. The prokaryotes. An Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Starr M. P.; Stolp H.; Truper H., G. (Eds). 1:1019-1022

- Stein L. Y y Arp D. J. 1998. Ammonium limitation results in the loss ammonia-oxidizing activity in *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (4):1514-1521.
- Strous M., Kuenen J. G. y Jette M. S. M. 1999. Key physiology of anaerobic ammonium-oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7): 3248-3250.
- Surmacz-Gorska J., Gernaey K., Demuynck C., Vanrolleghem P. y Verstraete W. 1996. Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Wat. Res.* 30(5): 1228-1236.
- Vayenas D. V., Pavlov S. y Lyberatos. 1997. Development of a dynamic model describing nitrification and denitrification in trickling filters. *Wat. Res.* 31(5):1135-1147.
- Villaverde S., García-Encina P. A. y Fdz-Polanco F. 1997. Influence of pH over nitrifying activity in submerged biofilters. *Wat. Res.* 31(5):1180-1186.
- Yang L. y Alleman J. F. 1998. Investigation of batwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture. *Wat. Sci. Tech.* 26(5-6):997-1005.
- Yoo H., Ahn K. H., Lee H. J., Lee K. Li., Swak Y. J. y Song K. G. 1999. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Wat. Res.* 33(1):145-154.
- Zhao H. W., Mavinic D., Oldhan W. K. y Koch F. A. 1999. Controlling factors for simultaneous nitrification and denitrification un a two-stage intermittent aeration process treating domestic sewage. *Wat. Res.* 33(4):961-970.

## VII ANEXO

### COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS SELECTIVOS PARA BACTERIAS NITRIFICANTES

De acuerdo a las referencias bibliográficas consultadas para las bacterias del tipo *Nitrosomonas*, se recomienda el siguiente medio de cultivo (Hanaki *et al.*, 1990a; Ronald, 1993).

|   |        |
|---|--------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3.0 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 0.5 g  |
| MnSO <sub>4</sub>                               | 0.05 g |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 4.0 g  |
| Fe/EDTA sol                                     | 0.1 mL |
| Verde cresol (0.0005 %)                         | 25 mL  |
| Diluir en 1 L de agua destilada                 |        |

Para evitar la precipitación de Mg y Ca, mantener el pH = 8.2 a 8.4 unidades durante el crecimiento con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> estéril al 50%.

Solución de Fe/EDTA

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| EDTA                                 | 0.14g   |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.5 g   |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. | 0.05 mL |
| Diluir en 1 L de agua destilada      |         |
| Ajustar a pH = 7.5 unidades          |         |

Formulación del medio de cultivo para *Nitrobacter* (Hanaki *et al.*, 1990a; Ronald, 1993).

|   |         |
|---|---------|
| NaNO <sub>3</sub>                               | 1.0 g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 0.5 g   |
| NaCl  | 0.3 g   |
| MgSO <sub>4</sub>                               | 0.5 g   |
| MnSO <sub>4</sub>                               | 0.002 g |
| Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | 0.005 g |

Diluir en 1 L de agua destilada