

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

Evaluación De La Capacidad Desnitrificante De Una Colección Bacteriana Obtenida Del  
Subsuelo Profundo En Colombia

Jose Manuel Diaz Buitrago

Trabajo De Grado Presentado Como Requisito Para Optar El Título De Biólogo

Director

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Phd. En Ciencias Agrícolas

Co-Director

Jhon Alexander Suescún Sepúlveda

Microbiólogo Y Bioanalista

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Ciencias

Escuela De Biología

Bucaramanga

2020

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

### **Agradecimientos**

Le agradezco a mis padres y familiares por su apoyo incondicional durante este proceso de formación académica; a la escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander y su equipo docente por brindarme todos sus conocimientos.

Especial gratitud al Doctor Jorge Luis Fuentes Lorenzo, por brindarme sus conocimientos y apoyo durante el desarrollo de esta pasantía, también expreso mi gratitud al microbiólogo y bioanalista Jhon Alexander Suescún Sepúlveda, por brindarme su orientación y a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental-UIS, por la acogida y las enseñanzas.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

**Tabla de Contenido**

Introducción .....	10
1. Objetivos De La Pasantía .....	15
1.1 Objetivo General Del Pasante .....	15
1.2 Objetivos Específicos .....	15
2 Competencias Que Desarrolló El Pasante.....	16
3. Metodología Para El Desarrollo De Las Competencias .....	16
3.1 Material Biológico.....	17
3.2 Procedimiento .....	17
3.3 Análisis Estadístico De Los Datos .....	20
4 Resultados.....	21
5 Discusión .....	28
6 Conclusiones .....	33
7. Recomendaciones .....	35
Referencias Bibliográficas .....	36

**Lista De Tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Resultados prueba de reducción de nitratos.....	19
<b>Tabla 2.</b> Aislados de la colección, agrupados a nivel de género.....	24
<b>Tabla 3.</b> Valores propios y su contribución al (ACP).....	25
<b>Tabla 4.</b> Análisis de componentes principales (ACP).....	25
<b>Tabla 5.</b> Número de especímenes para cada zona. ....	27

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

**Lista De Figuras**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Resultados prueba de reducción de nitratos.....	23
<b>Figura 2.</b> Análisis de clúster jerárquico.....	26
<b>Figura 3.</b> Desnitrificación, zonas del subsuelo.....	28

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

## RESUMEN

**TITULO:** EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE DE UNA COLECCIÓN BACTERIANA OBTENIDA DEL SUBSUELO PROFUNDO EN COLOMBIA \*

**AUTOR:** JOSE MANUEL DIAZ BUITRAGO \*\*

**PALABRAS CLAVE:** DESNITRIFICACIÓN, BACTERIAS, REDUCCIÓN DE NITRATOS, NITRÓGENO, ATMÓSFERA, CONTAMINACIÓN, BIORREMEDIACIÓN.

**DESCRIPCION:**

Las colecciones biológicas son repositorios importantes de información sobre biodiversidad, en las cuales se guardan datos fundamentales sobre los especímenes que habitan ecosistemas de regiones determinadas. La colección microbiana Cepario LMMA-UIS, contiene diversos especímenes microbianos, previamente obtenidos de diferentes ambientes del subsuelo profundo en Colombia (Mantos de carbón, Campos de petróleo y Volcanes de lodo); a los cuales se les realizó la prueba de reducción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). Esta evaluación dio como resultado que aproximadamente el 63% de la colección de aislados evaluados reducen el  $\text{NO}_3^-$  hasta nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Estos aislados correspondieron a los géneros bacterianos siguientes: *Acidovorax*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Marinobacter*, *Mixta*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Thauera*. Por otra parte, solo unos pocos aislados (~9%), fueron capaces de reducir el  $\text{NO}_3^-$  hasta nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ). Estos fueron aislados de los géneros: *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Thauera*, *Zobellella*. Los aislados restantes (28%), correspondientes a los géneros: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sporolactobacillus*, *Staphylococcus* y *Zobellella*; no mostraron efecto desnitrificante. Un análisis estadístico, basado en caracteres fenotípicos incluyendo la reducción parcial y total de  $\text{NO}_3^-$ , mostró que existe una relación entre el potencial desnitrificante, los taxones y el origen de los aislados bacterianos; revelando que la zona de volcanes de lodos presenta la mayor cantidad de aislados con potencial desnitrificante. Los resultados obtenidos, son discutidos en relación con su potencial en bio-remediación de ambientes contaminados con fertilizantes y diferentes compuestos nitrogenados derivados de la actividad antropogénica. Se concluye que la colección presenta aislados que tienen potencial desnitrificante que pueden ser utilizados en procesos de biorremediación.

---

\*Trabajo de Grado

\*\* Universidad Industrial De Santander, Facultad De Ciencias, Escuela De Biología

Director: FUENTES LORENZO, Jorge Luis. Microbiólogo, PhD. en Ciencias Agrícolas

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF THE DESNITRIFYING CAPACITY OF A BACTERIAL COLLECTION OBTAINED FROM THE DEEP SUBSUELE IN COLOMBIA \*

**AUTHOR:** JOSE MANUEL DIAZ BUITRAGO \*\*

**KEYWORDS:** DENITRIFICATION, BACTERIA, NITRATE REDUCTION, NITROGEN, ATMOSPHERE, POLLUTION, BIOREMEDIATION.

**DESCRIPTION:**

Biological collections are important repositories of biodiversity information, in which fundamental data on specimens that inhabit ecosystems in specific regions are kept. The Cepario LMMA-UIS microbial collection contains several microbial specimens, previously obtained from different deep underground environments in Colombia (coal mantles, oil fields and mud volcanoes); who were tested for nitrate reduction ( $\text{NO}_3^-$ ). This evaluation resulted in approximately 63% of the collection of isolates evaluated reducing  $\text{NO}_3^-$  to nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). These isolates corresponded to the following bacterial genera: *Acidovorax*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Marinobacter*, *Mixed*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* and *Thauera*. On the other hand, only a few isolates (~ 9%) were able to reduce  $\text{NO}_3^-$  to gaseous forms of nitrogen such as molecular nitrogen ( $\text{N}_2$ ). These were isolated from the genera: *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Thauera*, *Zobellella*. The remaining isolates (28%), corresponding to the genera: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sporolactobacillus*, *Staphylococcus* and *Zobellella*; They showed no denitrifying effect. A statistical analysis, based on phenotypic characters including the partial and total reduction of  $\text{NO}_3^-$ , showed that there is a relationship between denitrifying potential, taxa and the origin of bacterial isolates; revealing that the sludge volcano area has the highest amount of isolates with denitrifying potential. The results obtained are discussed in relation to their potential in bio-remediation of environments contaminated with fertilizers and different nitrogen compounds derived from anthropogenic activity. It is concluded that the collection presents isolates that have denitrifying potential that can be used in bioremediation processes.

---

\*Bachelor Thesis

\*\* Universidad Industrial De Santander, Facultad De Ciencias, Escuela De Biología

Director: FUENTES LORENZO, Jorge Luis. Microbiólogo, PhD. en Ciencias Agrícolas

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

### Introducción

El nitrógeno es un elemento fundamental para todos los seres vivos y forma parte de macromoléculas esenciales como lo son: proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, entre otras. Este constituye el cuarto elemento más abundante de la biomasa del planeta, después de compuestos como: carbono, hidrogeno y oxígeno (Rincón & Gutiérrez, 2012). El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre (78%), y dado su estado inerte o gaseoso, no puede ser incorporado directamente por la mayoría de los seres vivos. Así, es considerado el nutriente limitante más importante en la producción primaria de las cadenas tróficas y durante el crecimiento vegetal (Munch & Velthof, 2007).

La incorporación del nitrógeno atmosférico en los seres vivos se lleva a cabo a través del ciclo biogeoquímico del nitrógeno, que incluye tanto procesos bióticos y abióticos: el primer paso de este ciclo es la conversión del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a formas químicas que puedan ser incorporadas por los seres vivos como son: el ion amonio ( $NH_4^+$ ), los iones nitrito ( $NO_2^-$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ) o también en gases como el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), altamente reactivos que derivan fácilmente en alguno de los compuestos anteriores (Capone, Popp, Flood, & Neelson, 2006).

Los microorganismos son parte activa de los procesos que fijan el nitrógeno atmosférico o modifican las diferentes formas químicas de este en ambientes terrestres, así como, en los cuerpos de agua continentales y oceánicos; el primer paso es la fijación biológica del nitrógeno, esta se lleva a cabo por unos pocos grupos microbianos conocidos en su conjunto como Diazótrofos (Braker & Conrad, 2011); los cuales reducen el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a nitrógeno orgánico y/o amonio ( $NH_4^+$ ) que puede ser asimilado por los seres vivos mediante la vía glutamina sintetasa (Correa, 2016). Entre los microorganismos Diazótrofos se encuentran bacterias de vida libre que

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

habitan el suelo (*Azotobacter*, *Klebsiella*, *Rhodospirillum*) y los cuerpos de agua (Cianobacterias); así como, los simbiosntes de plantas (*Rhizobium*) y de helechos acuáticos (*Anabaena*).

Algunos grupos bacterianos (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*) convierten el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) en nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y otras (*Nitrobacter*) transforman éste en nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), proceso conocido como nitrificación; este proceso consiste en la oxidación biológica del amonio en nitrito en presencia de oxígeno, seguido de la oxidación de estos nitritos en nitratos, produciendo energía que es destinada a la síntesis de ATP (Cabrera, 2007). El nitrato procedente de la nitrificación puede ser reducido por la enzima nitrato reductasa asimiladora (Nas) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) que, a su vez, puede convertirse por medio de la enzima nitrito reductasa (Nir) en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) que posteriormente, es asimilado mediante la vía GS-GOGAT (Braker & Conrad, 2011).

La desnitrificación es una forma de respiración en ausencia de oxígeno mediante la cual ciertos microorganismos (*Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Rhizobium*, *Thiosphaera*) reducen de forma secuencial el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y/o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a  $\text{N}_2$  gaseoso usando como intermediarios los gases óxido nítrico (NO) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Pérez-Peláez, Peña-Varón, & Sanabria, 2011). En el proceso participan las enzimas integrales de membrana nitrato reductasa y óxido nítrico reductasa que acoplan la translocación de protones a la reducción del nitrato y del óxido nítrico. Aunque la respiración del nitrato produce menos ATP que la respiración oxigénica, esta es suficiente para permitir el crecimiento de las bacterias que lo realizan (Simon, van Spanning, & Richardson, 2008). Este proceso, el cual impulsa el retorno del nitrógeno gaseoso a su ciclo, es dependiente únicamente de estos microorganismos que respiran nitrógeno; si no es mantenido se producen alteraciones que repercuten de manera negativa en los ecosistemas (Capone et al., 2006).

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

Las bacterias capaces de realizar una desnitrificación completa, es decir, reducir el nitrato hasta  $N_2$  gaseoso son escasas en la naturaleza (Flores, 2005). Muchas de las bacterias desnitrificantes no poseen o no expresan todas las enzimas necesarias para llevar a cabo cada una de las reducciones individuales que integran el proceso; así, la ausencia en estos microorganismos de la enzima óxido nítrico reductasa originaría la acumulación de NO y la ausencia de la enzima óxido nitroso reductasa originarían la acumulación de  $N_2O$  (Jones, Stres, Rosenquist, & Hallin, 2008; Zumft & Kroneck, 2006).

La desnitrificación es el único proceso biológico conocido para disminuir el exceso de nitratos que contaminan el medio ambiente, y regresar el nitrógeno a la atmosfera para que continúe con el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, pero, a su vez, es un mecanismo por el cual se liberan a la atmosfera NO y  $N_2O$ , dos potentes gases de efecto invernadero (Correa, 2016). Las actividades antropogénicas han alterado el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, aumentando las cantidades de nitrógeno reactivo en la atmósfera, el suelo y los afluentes hídricos; algunos ejemplos de estas actividades son los siguientes: el uso de fertilizantes agrícolas, las emisiones por combustión de combustibles fósiles, desechos de la industria alimenticia y producción animal y de la actividad humana (Albert, 1997; Boyer et al., 2018; Herrera, Vargas, & Marín, 2000; Rodríguez, Castellanos, González, Hernández, & Contreras, 2006).

Aproximadamente 60 toneladas de formas reactivas de nitrógeno llegan a los océanos mediante su transporte por aguas subterráneas y superficiales (Boyer et al., 2018). El nitrato no es tóxico para la salud humana, pero este puede transformarse en nitrito por las bacterias gastrointestinales, forma que si es tóxica (Muñoz, Armienta, Andrea, & Ceniceros, 2011). Dicha toxicidad se debe a que la hemoglobina de los glóbulos rojos tiene mayor afinidad por el nitrito que por el oxígeno, por lo que reacciona con él para formar metahemoglobina que dificulta e impide el transporte

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

adecuado del oxígeno a los tejidos lo que produce hipoxia (Avery, 1999). A nivel global, el transporte de compuestos nitrogenados por los diferentes afluentes ha producido durante las últimas décadas un considerable incremento de la intensidad, extensión y duración de las floraciones de algas (eutrofización) originando situaciones de hipoxia que han acarreado: la degradación del hábitat, alteraciones de la cadena alimentaria y pérdida de la biodiversidad del ecosistema (Diaz & Rosenberg, 2008; Sutton et al., 2011).

En la prueba de reducción de nitratos, la reducción del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y/o a nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ), se genera por anaerobiosis; en este proceso, un microorganismo obtiene su oxígeno del nitrato; este oxígeno actúa como un aceptor de hidrógeno, es decir, es el protón y el aceptor final de electrones. Las bacterias aerobias, actúan como anaerobias facultativas y solo pueden reducir los nitratos en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaerobia es un proceso de oxidación en el que las sustancias inorgánicas producen oxígeno para actuar como un aceptor de electrones durante la producción de energía (Almazán, Coma, Coda, & Pujol, 2002). En la reducción de nitratos, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas. Gunsalus & Stanier en (1961) establecieron que el nitrato actúa como último oxidante en los sistemas de citocromos. Las posibilidades del producto final en la reducción del nitrato son muchas: nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), el producto formado dependerá de la especie bacteriana (MacFaddin, 2003).

Las colecciones biológicas son conceptualmente bancos de datos como lo son las bibliotecas o los centros de documentación; de igual modo, son consideradas patrimonio nacional y cultural con interés para toda la humanidad, por ser estimados como la fuente primaria de conocimiento y de información sobre la biodiversidad, razón por la cual, deben ser protegidas, mantenidas y debidamente curadas, garantizando su permanencia en el tiempo (Simmons & Muñoz-Saba, 2005).

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

Dichas colecciones proporcionan evidencia irremplazable de los acontecimientos históricos a largo plazo, al permitir a los investigadores realizar estudios a futuro. Además, las colecciones biológicas, no solo preservan a los ejemplares usando distintos métodos de conservación para su óptimo aprovechamiento, sino que éstas poseen documentación de distinto tipo, como bibliografía, fotos, bancos de ADN, especímenes preservados, bancos de tejidos, audios, entre otros (Darrigran, 2012). La creciente demanda de las colecciones microbianas, la complejidad de sus tareas y la importancia de la calidad en su servicio requiere el conocimiento de los lineamientos exigidos (González Gil & Jiménez Quiceno, 2013). Es necesaria la información sobre la diversidad de rutas metabólicas de los especímenes de la colección para identificar candidatos con el fin de que se establezcan procesos biológicos de remediación basados en la reducción de nitratos (Delgadillo & Góngora, 2009).

Considerando lo anteriormente descrito, la presente pasantía de investigación tuvo como propósito evaluar la capacidad desnitrificante de una colección bacteriana perteneciente al Cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental-UIS (LMMA-UIS,) que fue obtenida a partir del subsuelo profundo en Colombia; utilizando la prueba de reducción de nitratos, en la cual se obtuvieron tres diferentes resultados: En primer lugar, se identificaron los aislados microbianos que tienen la capacidad de realizar la reducción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) hasta nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ). En segundo lugar, se identificaron los aislados microbianos que reducen los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) hasta nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ). Finalmente, se identificaron aislados bacterianos que no realizan el proceso de desnitrificación, es decir, dan negativo para la prueba de reducción de nitratos. Dichos resultados fueron evidenciados, corroborados con la literatura y almacenados en archivos digitales los cuales pasaron a ser parte del Cepario LMMA-UIS.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

### **1. Objetivos De La Pasantía**

#### **1.1 Objetivo General Del Pasante**

Determinar la capacidad desnitrificante de los microorganismos presentes en una colección bacteriana obtenida del subsuelo profundo en Colombia.

#### **1.2 Objetivos Específicos**

Realizar la prueba de reducción de nitratos a una colección bacteriana obtenida del subsuelo profundo en Colombia.

Identificar los microorganismos presentes en la colección bacteriana que son potencialmente desnitrificantes.

Establecer si existe relación del potencial desnitrificante con los diferentes ambientes a partir de los que se aislaron los especímenes microbianos.

Elaborar una base de datos que contenga los resultados obtenidos para la prueba de reducción de nitratos, realizada a cada uno de los microorganismos presentes en la colección.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

### 2 Competencias Que Desarrolló El Pasante

Desarrolló habilidades en el manejo de equipos y en la preparación de materiales de laboratorio, medios de cultivo y soluciones para la prueba de reducción de nitratos.

Adquirió habilidades en el análisis de datos.

Analizó e interpretó los resultados de la investigación científica.

Mejóro sus habilidades de escritura y divulgación científica.

### 3. Metodología Para El Desarrollo De Las Competencias

En este apartado, se presentará la metodología que se desarrolló para lograr evaluar la capacidad desnitrificante de una colección bacteriana obtenida del subsuelo profundo en Colombia, en tres diferentes ambientes como lo son: petróleo, mantos de carbón y volcanes de lodo; para esto se tuvieron en cuenta todos los materiales requeridos y las instalaciones necesarias para llevar acabo dicho proceso y así dar cumplimiento al objetivo de la pasantía, como se indica a continuación: En primer lugar, el material biológico que es el objeto de estudio, seguidamente se presentará el procedimiento experimental; el cual consiste en la inoculación, implementación de la prueba de reducción de nitratos, los controles que han sido establecidos previamente por la literatura para la prueba de reducción de nitratos y finalmente el análisis estadístico de los resultados.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

### **3.1 Material Biológico.**

Los microorganismos usados en la presente pasantía, así como la información sobre su curación básica, medios de cultivo para el crecimiento de cada uno de los aislados microbianos e identificación taxonómica, fueron suministrados por el Cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental-UIS (Cepario LMMA-UIS) de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

### **3.2 Procedimiento**

**3.2.1 Inoculación.** A partir de caldos de cultivo puros y frescos de especímenes microbianas y cepas control, se inoculó 1 mL de cultivo en tubos tapa rosca que contenía 10 mL del medio caldo nitrato (Nitrato de Potasio) y una campana de Durham, para evidenciar la producción de gas durante la reducción de nitratos. Se incubaron durante un periodo entre 24 a 48 horas bajo las condiciones óptimas de crecimiento de cada estirpe según lo indicado por MacFaddin (2003).

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

**3.2.2 Prueba De Reducción De Nitratos.** Concluido el tiempo de incubación, se agregó a cada uno de los tubos, cinco gotas del reactivo A (ácido sulfanílico 0,8 % p/v) y cinco gotas del reactivo B (N,N-dimetil-1-naftilamina 0,6 % v/v). La aparición de una tonalidad roja o rosada, posterior a la adición de los reactivos, es indicativo de reducción de nitratos a nitritos (desnitrificación parcial) (Ahn, 2006). Si la suspensión era incolora después de la adición de los reactivos A y B (no hay nitritos), se procedió a agregar un granulo de zinc al medio, se agitó el tubo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Si el medio permanecía incoloro después de la adición del granulo de zinc, el resultado indica reducción de nitratos - nitritos - nitrógeno gaseoso (desnitrificación total) (Ahn, 2006). Si el medio se torna rosado después de la adición del granulo de zinc, el resultado es negativo para la reducción de nitratos por parte de la bacteria como se observa en la Tabla 1 (MacFaddin, 2003).

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

**Tabla1.** Resultados prueba de reducción de nitratos.

<b>RESULTADO</b>	<b>FOTO</b>
<b>PRUEBA DE REDUCCION DE NITRATOS</b>	
Desnitrificación parcial (reducción de nitratos a nitritos)	
Desnitrificación Total (reducción de nitratos a nitrógeno atmosférico)	
Negativo	

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

**3.2.3 Controles.** A cada microorganismo se le realizó la prueba por triplicado, con el fin de evitar alteraciones en los resultados o problemas de contaminación y asegurar reproducibilidad en la prueba. Se tomaron tres microorganismos que son referentes en la literatura y cepas de referencia (ATCC), como control para la prueba de reducción de nitratos: *Escherichia coli* (ATCC®33876™), positiva en la prueba para reducción de nitratos a nitritos, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC®638™), positiva en la prueba para reducción de nitratos a nitrógeno gaseoso y *Clostridium bifermentans* (ATCC®638™), negativo para la prueba de reducción de nitratos (MacFaddin, 2003).

### 3.3 Análisis Estadístico De Los Datos

Con los resultados obtenidos a partir de la prueba de reducción de nitratos, se calculó el valor promedio del porcentaje de aislados de la colección, correspondiente a cada uno de los tres posibles resultados de esta prueba. Adicionalmente, se estimó el número de aislados de la colección en cada categoría para los diferentes lugares de procedencia (mantos de carbono, volcanes de lodo y campos de petróleo). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando los softwares R v.3.5.1 y su interfaz gráfica Rstudio v.1.1.456; con el fin de ver las diferencias significativas de los procesos de desnitrificación total y parcial entre cada una de las zonas de procedencia y una prueba de Tukey para determinar entre que pares de zonas se presentan dichas diferencias significativas.

El Cepario LMMA-UIS de la escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander, proporcionó las pruebas de curación básicas de la colección bacteriana obtenida a partir del subsuelo profundo en Colombia entre las cuales se encuentran: formación de spora, tinción de

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

gram, relación con el oxígeno, oxidasa, catalasa, motilidad y forma celular. Con los resultados de estas pruebas y los de la prueba de reducción de nitratos, se elaboró una matriz de datos única. A partir de esta matriz, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando los softwares R v.3.5.1 y su interfaz gráfica Rstudio v.1.1.456; esto con el fin de identificar las variables que más contribuyen a la variabilidad de la muestra poblacional y conocer el valor relativo de la prueba de reducción de nitratos respecto a las otras variables para explorar la diversidad metabólica de la colección. Con estas variables, se realizó un análisis de clúster jerárquico utilizando el programa SPSS v.25.0 (IBM SPSS statistics Base) con el fin de conocer si existe una relación de la mencionada diversidad metabólica de la colección con los taxones y con su origen.

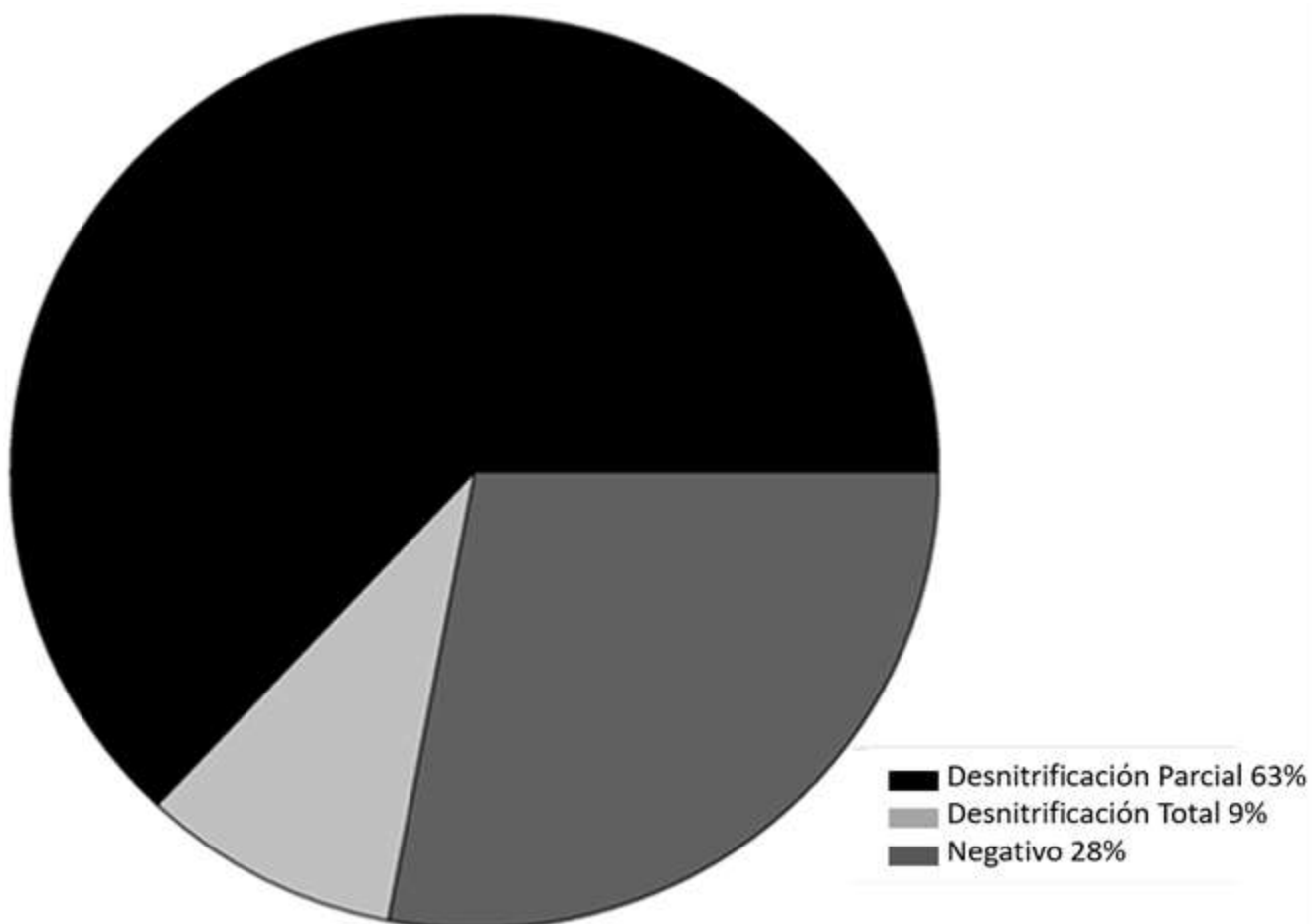
### **4 Resultados**

Se evaluaron 280 especímenes pertenecientes a una colección obtenida del subsuelo profundo en Colombia. A dichos especímenes se les evaluó el potencial desnitrificante a través de la prueba de reducción de nitratos. Para esto, se estimó el porcentaje de especímenes de la colección que responden a cada uno de los tres posibles resultados de la prueba de reducción de nitratos (Figura 1).

La prueba proporcionó los siguientes resultados: reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) hasta nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) denominado Desnitrificación Parcial, de nitrato hasta nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) denominado Desnitrificación Total y negativo para la prueba de reducción de nitratos. Se observó que el 63 % de los aislados realizan el proceso de reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  (Desnitrificación Parcial), el 9 % de los aislados bacterianos realizan el proceso de reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  (Desnitrificación Total)

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

y, por último, el 28 % de los aislados evaluados dieron un resultado negativo para la prueba de reducción de  $\text{NO}_3^-$ , es decir no realizan el proceso de desnitrificación.



**Figura 1.** Porcentaje de especímenes que corresponden a cada uno de los tres resultados obtenidos de la prueba de reducción de nitratos. Desnitrificación Parcial:  $\text{NO}_3^-$  hasta nitrito  $\text{NO}_2^-$ , Desnitrificación Total: de nitrito hasta nitrógeno atmosférico  $\text{N}_2$  y negativo para la prueba de reducción de nitratos.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

Los tres posibles resultados que aportó la prueba de reducción de nitratos son presentados en la Tabla 2 junto con los especímenes identificados a nivel de género para cada posible resultado de la prueba de reducción de nitratos.

**Tabla 2.** Aislados de la colección, agrupados a nivel de género, para cada uno de los resultados de la prueba de reducción de nitratos.

<b>Resultado Prueba De Reducción De Nitratos</b>	<b>Géneros</b>
<b>Desnitrificación parcial (reducción de nitratos a nitritos)</b>	<i>Acidovorax, Bacillus, Citrobacter, Cutibacterium, Enterobacteria, Escherichia, Halomonas, Klebsiella, Listeria, Marinobacter, Mixta, Ochrobactrum, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Staphylococcus, Thauera.</i>
<b>Desnitrificación Total (reducción de nitratos a nitrógeno atmosférico)</b>	<i>Achromobacter, Pseudomonas, Rhizobium, Thauera, Zobelletta.</i>
<b>Negativo</b>	<i>Acinetobacter, Alcaligenes, Bacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Desulfovibrio, Lysinibacillus, Microbacterium, Pseudomonas, Rhizobium, sporolactobacillus, Staphylococcus, Zobelletta.</i>

Con los datos de la curación básica de la colección suministrados por el Cepario LMMA-UIS, incluyendo los datos de desnitrificación, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), para ver las variables representativas de la diversidad fenotípica de la colección, las cuales fueron: tinción de gram positiva, formación de esporas, forma celular bacilo, forma celular Vibrio, crecimiento en anaerobiosis, motilidad, oxidasa, desnitrificación parcial, desnitrificación total y

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

negativo para la reducción de nitratos. Los cuatro primeros componentes principales del análisis (Tabla 3) explicaron el 75 % de la variación total de los datos en el análisis.

**Tabla 3.** Valores propios y su contribución a la varianza para el análisis de componentes principales (ACP).

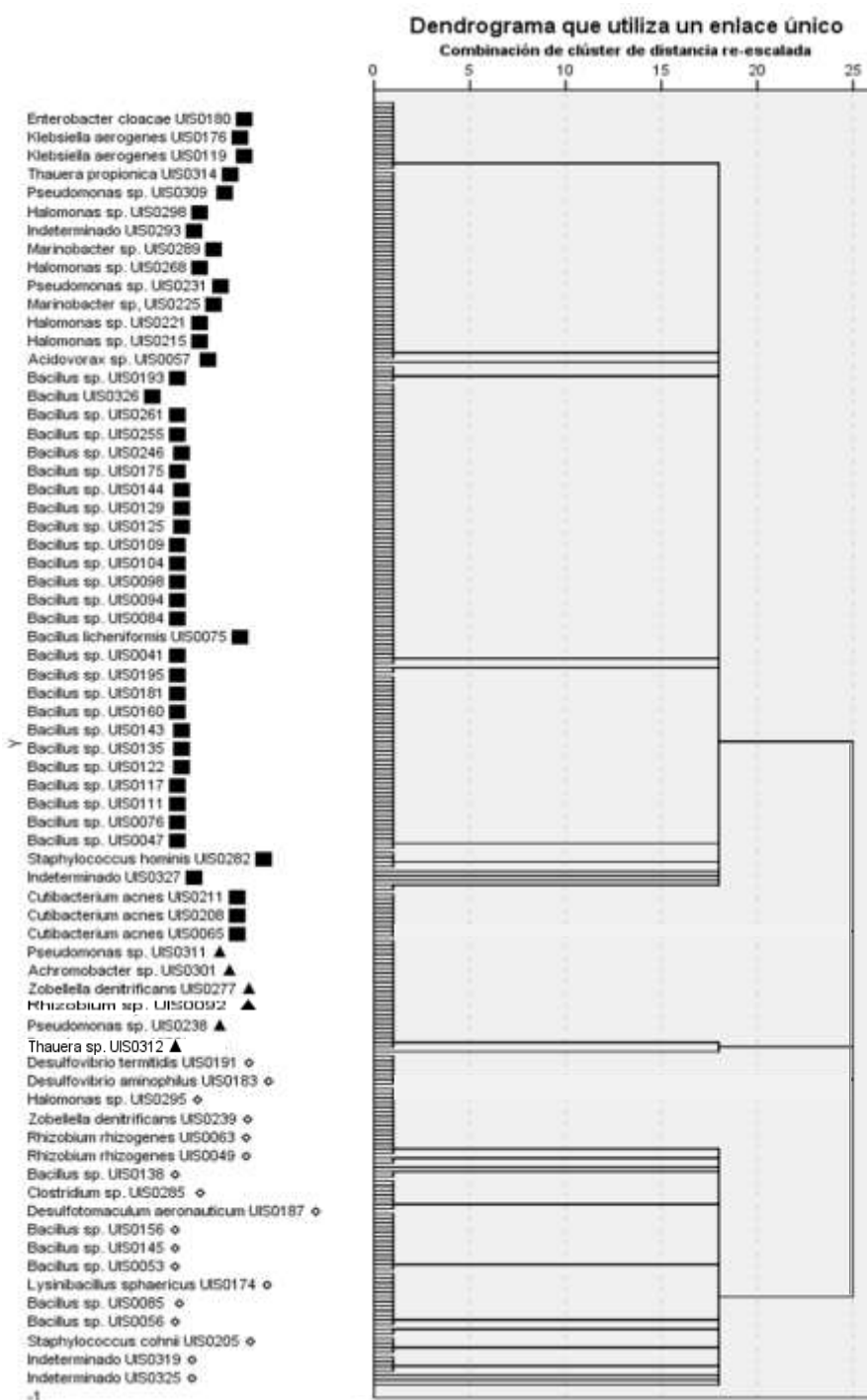
Importancia de los componentes	PC1	PC2	PC3	PC4
Valor propio	0.5719	0.3809	0.2240	0.1458
Proporción explicada	0.3214	0.2114	0.1259	0.0819
Proporción acumulada	<b>0.3214</b>	<b>0.5355</b>	<b>0.6614</b>	<b>0.7512</b>

**Tabla 4.** Análisis de componentes principales (ACP) para determinar variables representativas, utilizando la información de la curación básica de la colección suministradas por el LMMA-UIS.

	PC1	PC2	PC3	PC4
G. Positivo	<b>1.56601615</b>	0.31021725	0.268388078	0.35635071
F. Espora	<b>1.35932448</b>	<b>1.00480574</b>	0.444900350	0.20622105
Bacilo	0.21769685	<b>0.90845585</b>	0.115441985	0.09121141
Coco	0.09884422	0.28247624	0.077170334	0.10556806
Vibrio	0.08510631	<b>0.56846819</b>	0.037686899	0.07668777
Motilidad	0.17381736	<b>0.63990651</b>	0.247804740	0.21875925
Aerobio	0.23150882	0.38974360	0.163888741	0.07984844
Anaerobio	<b>1.23440517</b>	0.41578622	0.029281828	<b>1.00857109</b>
Catalasa	0.24467548	0.37194506	0.383396640	0.47751673
Oxidasa	<b>0.87492467</b>	<b>1.13461185</b>	0.115154817	<b>0.60718595</b>
D. Parcial	0.54707535	0.47714824	<b>1.489574904</b>	0.12717797
D. Total	<b>0.53889839</b>	0.01488953	0.367858783	0.03038992
Negativo	0.42582523	<b>0.71253623</b>	0.29856321	0.17895623

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

Al realizar el análisis de clúster jerárquico, utilizando los datos aportados por el ACP, se evidenció un agrupamiento de los aislados de la colección respecto a cada uno de los resultados de la prueba de reducción de nitratos (Figura 2) y demás pruebas de curación.



## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

■ Desnitrificación Parcial (reducción de Nitratos a Nitritos)

▲ Desnitrificación Total (reducción de Nitratos a Nitrógeno atmosférico)

☉ Negativo

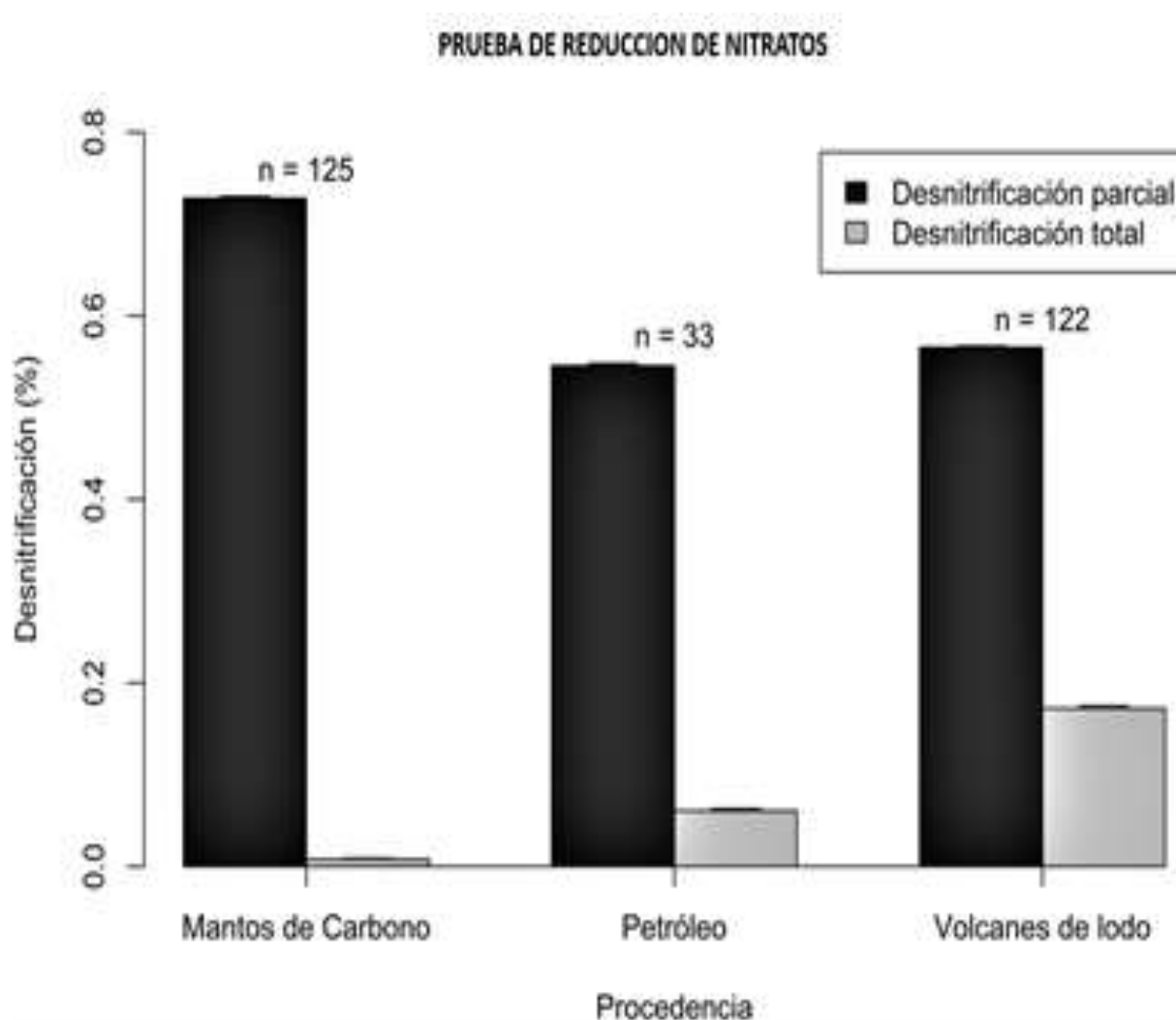
**Figura 2.** Análisis de clúster jerárquico, agrupamiento según los datos proporcionados por el análisis de componentes principales y la prueba de reducción de nitratos.

Adicionalmente, el número de especímenes considerando la zona de procedencia y los resultados de la prueba de reducción de nitratos se observa en la Tabla 5. Así como el porcentaje de los especímenes que realizan los procesos de desnitrificación total y parcial para cada una de las zonas del subsuelo profundo se observa en la Figura 3.

**Tabla 5.** Número de especímenes para cada uno de los resultados de la prueba de reducción de nitratos y su procedencia.

Zona de procedencia	Desnitrificación Parcial	Desnitrificación Total	Negativo	Total
Mantos de carbono	91	1	33	125
Campos de petróleo	18	2	13	33
Volcanes de lodo	69	21	33	122

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE



**Figura 3.** Porcentaje de especímenes microbianos que realizan los procesos de desnitrificación parcial y desnitrificación total para cada una de las zonas del subsuelo profundo.

Un análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas entre las frecuencias de especímenes que para diferentes zonas del subsuelo profundo producen desnitrificación parcial y total ( $p \leq 0.05$ ). Se evidenció que no existen diferencias significativas entre ninguna de las zonas para el proceso de desnitrificación parcial ( $p = 0.051$ ). Por el contrario, el análisis de varianza realizado para el proceso de desnitrificación total mostró diferencias significativas entre las zonas

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

del subsuelo profundo estudiadas ( $p \leq 0.000068$ ). Una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) mostró diferencias significativas entre las zonas mantos de carbono y volcanes de lodos ( $p \leq 0.0000039$ ) para el proceso de desnitrificación total; pero no entre las otras posibles iteraciones [Campos de petróleo versus Mantos de carbono ( $p = 0.57833$ ), Volcanes de lodo versus Campos de petróleo ( $p = 0.076591$ )]. Sin embargo, un análisis menos riguroso ( $p \leq 0.1$ ) mostró, que existen diferencias significativas entre las zonas para el proceso de desnitrificación parcial ( $p \leq 0.051$ ), y según la prueba de Tukey entre las zonas de volcanes lodos versus mantos de carbono ( $p = 0.0730$ ), sin embargo entre las otras zonas no se reportaron diferencias significativas, zonas de volcanes de lodos y campos de petróleo ( $p = 0.9363$ ) y las zonas de campos de petróleo y mantos de carbono ( $p = 0.1842$ ); para el proceso de desnitrificación total se mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.000068$ ), dichas diferencias mostradas según la prueba de Tukey entre las zonas de volcanes de lodos versus mantos de carbono ( $p \leq 0.0000039$ ) y las zonas de volcanes de lodo versus campos de petróleo ( $p \leq 0.076591$ ) y no mostrando diferencias entre las zona de Campos de petróleo versus Mantos de carbono ( $p = 0.57833$ ).

## 5 Discusión

El presente estudio mostró el potencial desnitrificante de una colección obtenida a partir del subsuelo profundo en Colombia. De acuerdo con los resultados se constató el 9% de la colección son especímenes potencialmente desnitrificantes (desnitrificación total), representado por los géneros: *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Thauera*, y *Zobellella*. Estos especímenes pueden resultar útiles para la implementación de estudios relacionados con procesos de

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

biorremediación y restauración de ecosistemas afectados por contaminación con compuestos nitrogenados. Tales grupos microbianos han sido identificados por reducir compuestos nitrogenados hasta nitrógeno atmosférico (Sneath, Mair, Sharpe, & Holt, 1986; MacFaddin, 2003).

Un estudio previo Castro-González, (2014) que evaluó la comunidad desnitrificante en la columna del embalse de Prado en Tolima, mostró bajo porcentaje de microorganismos que pueden reducir los compuestos nitrogenados a  $N_2$ . La reducción de nitratos a nitrógeno gaseoso requiere de la presencia del gen *nosZ*, conocidos por codificar la enzima óxido nitroso reductasa, muy común en especies del género *Pseudomonas*. Especies del género *Pseudomonas* son muy frecuentes en zonas agrícolas donde se han aplicado altos niveles de fertilizantes nitrogenados como urea (Fan et al., 2016; Henry, Bru, Stres, Hallet, & Philippot, 2006). Los estudios anteriormente mencionados comprueban lo encontrado durante el desarrollo de la pasantía, donde los especímenes del género *Pseudomonas* tiene la capacidad de reducir compuestos nitrogenados como los nitratos hasta nitrógeno atmosférico siendo considerado de gran importancia en procesos de biorremediación de los suelos y afluentes hídricos, que han sido contaminados con compuestos nitrogenados como los nitratos.

Por otra parte, de Mesa, Quintero, & Ortiz, (2006) estudiando suelos contaminados con abonos nitrogenados, mostraron la presencia de las especies potencialmente desnitrificantes como sigue: *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter* sp., *Propionibacterium* sp, *Peptoestreptococcus* sp, *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Clostridium* sp. y *Actinomyces* sp.). Estos autores demostraron que especies del género *Bacillus* son fuertes desnitrificantes convirtiendo los nitratos a nitritos en solo 24 horas, lo que concuerda con los resultados presentados en la Tabla 1.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

En la pasantía, se encontró un espécimen del género *Rhizobium* que presenta desnitrificación total, demostrando mediante la implementación de la prueba de reducción de nitratos su capacidad de reducir compuestos nitrogenados hasta nitrógeno gaseoso. Estos resultados están en correspondencia con lo observado por Ahn (2006), quien indicó que algunos géneros del orden Rhizobiales, entre los que se encuentran especies del género *Rhizobium*, tienen la capacidad de reducir compuestos nitrogenados hasta nitrógeno gaseoso. Ellos sugirieron su uso en procesos biotecnológicos para la eliminación de residuos derivados del nitrógeno. Se ha indicado que este tipo de procesos es de gran utilidad en las diferentes zonas agrícolas ya que permite un mayor aprovechamiento del nitrógeno en las variadas plantaciones de cultivos y evita la sobrecarga de compuestos nitrogenados en el suelo que afecten la producción y generen pérdidas económicas a la industria agrícola (Garzón Zúñiga, 2005).

Dos de los especímenes analizados en la pasantía, pertenecientes al género *Zobellella*, presentaron la capacidad de reducir  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  (desnitrificación total), lo cual coincide con lo reportado por Lin & Shieh, (2006), quienes exponen que el género *Zobellella* presenta una gran diversidad metabólica. Además, a este género pertenecen las especies *Zobellella denitrificans* y *Zobellella taiwanensis*, que presentan la capacidad de realizar una reducción del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) hacia productos gaseosos como el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) o ( $\text{N}_2$ ). Asimismo, estas especies tienen la capacidad de lograr un crecimiento anaerobio utilizando no solo el nitrato, sino también nitrito u óxido nitroso como aceptor de electrones.

Durante el desarrollo de la pasantía se encontró que un espécimen del género *Thauera* presenta desnitrificación total, lo que concuerda con el trabajo realizado por Scholten *et al.*, (1999), quienes encontraron que especies del género *Thauera* tiene la capacidad de realizar procesos de desnitrificación que pueden ser utilizados para el tratamiento de aguas residuales y diferentes

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

procesos de biorremediación que tengan relación con la contaminación por compuestos nitrogenados.

Por su parte, un espécimen del género *Achromobacter* presentó la capacidad de reducir nitratos hasta nitrógeno atmosférico (desnitrificación total) concordando con el estudio realizado por McGuirl *et al.* (1998) quienes evidencian que la especie *Achromobacter cycloclastes* presenta el grupo de genes *nos* conocidos por codificar la producción de la enzima óxido nitroso reductasa (gen *nosZ*) que transforma el óxido nitroso hasta nitrógeno atmosférico.

En los resultados de la pasantía, se cuenta con especímenes que realizan el proceso de reducción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) hasta Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), como es el caso de los géneros: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Providencia*, *Citobacter*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Hallomonas*, *Marinobacter*, *Zobellella*, *Ochrobactrum*, y *Listeria*, proceso generado por la presencia de la enzima Nitrato reductasa, la cual es codificada según los autores mencionados anteriormente por los genes *narG* y *napA* (Braker, Zhou, Wu, Devol, & Tiedje, 2000; Harter, El-Hadidi, Huson, Kappler, & Behrens, 2017). Sin embargo, estos géneros carecen de los genes *nirk* y *nirS*, que codifican para la producción de la enzima nitrito reductasa encargada de reducir los iones nitrito y los genes *norB* y *nosZ* encargados de completar el proceso de reducción de nitratos hasta nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) (Harter *et al.*, 2017).

En esta pasantía también fueron identificados especímenes que dieron negativo a la prueba de reducción de nitratos; estos géneros son: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *sporolactobacillus*, *Staphylococcus* y *Zobellella*, es decir, no reducen los nitratos presentes en el medio. Se cree, que esto es debido a que no presentan los genes que codifican para la producción

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

enzimática necesaria para realizar la reducción de los compuestos nitrogenados (Harter et al., 2017). Por tanto, se hace necesario aclarar que la desnitrificación no es una característica que agrupe grupos filogenéticos, ya que esta se encuentra extendida entre los diferentes grupos que filogenéticamente no están relacionados o como en el caso de nuestro estudio donde tenemos aislados de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Rhizobium* que realizan reducción de Nitratos a Nitritos y otros aislados de los mismos géneros que son negativos para la prueba de reducción de nitratos (Braker et al., 2000; Yin et al., 2015).

En el desarrollo de la pasantía y utilizando los datos del lugar de procedencia del subsuelo profundo de la colección estudiada, se evidenció que la zona de lodos volcánicos presenta la mayor cantidad de especímenes que realizan el proceso de desnitrificación total lo cual concuerda con lo expuesto por Kokoschka et al., (2015) donde se señala que los volcanes de lodos son sitios de filtración de diferentes tipos de compuestos impulsados por la presión tectónica, lugares en los cuales habitan diferentes estirpes microbianas que viven en condiciones anaerobias y que están involucrados en diferentes ciclos biogeoquímicos como azufre, carbono, nitrógeno y oxígeno (Kokoschka et al., 2015). Además según (Niemann et al., 2006) las zonas de lodos volcánicos son sitios donde prospera la actividad microbiana, principalmente microorganismos anaerobios, que logran sobrevivir en dichos ambientes, utilizando sus capacidades metabólicas para el aprovechamiento de los recursos disponibles como los son compuestos derivados de: carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno entre otros, que permanecen en dicho ambiente debido a su actividad. Según (Meslé et al., 2013) las zonas de mantos de carbono y de campos de petróleo se caracterizan por presentar actividad microbiana, relacionada con microorganismos que degradan hidrocarburos, además dichas zonas no presentan los niveles de anoxia y la gran variedad de compuestos químicos presentes en la zonas de lodos volcánicos.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

El subsuelo profundo se ha caracterizado por albergar diferentes comunidades microbianas, las cuales presentan una amplia diversidad metabólica, que es necesaria para el aprovechamiento de una amplia gama de fuentes de energía presentes en el sub suelo profundo, procedente de compuestos derivados del carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno entre otros, además dichas comunidades microbianas presentan un funcionamiento cooperativo lo cual les permite el aprovechamiento de los recursos en el ambiente que habitan (Ravindran, 2017).

Finalmente, la pasantía demostró el potencial desnitrificante de la colección bacteriana obtenida a partir del subsuelo profundo, identificando microorganismos que realizan la reducción de los nitratos hasta nitritos, nitrógeno atmosférico y aquellos que no tiene la capacidad de reducir los compuestos nitrogenados. Toda esta información quedó almacenada en archivos digitales que pasaron a ser parte de la colección microbiana del Cepario LMMA-UIS. De aquí partirán futuras investigaciones que conlleven a fortalecer la base de datos de la colección y a la búsqueda de soluciones a las diferentes problemáticas presentadas en los ecosistemas de la región.

## 6 Conclusiones

Los microorganismos de la colección bacteriana obtenida a partir del subsuelo profundo colombiano presentan potencial desnitrificante; un porcentaje de los aislados bacterianos (9%) demostraron la capacidad para reducir compuestos nitrogenados como los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) hasta nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ), (desnitrificación total) estos pertenecen a los géneros: *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Thauera* y *Zobellella*.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

La prueba de reducción de nitratos logró evidenciar que, aparte de los géneros reductores de los compuestos nitrogenados a nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), existen géneros como: *Acidovorax*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Marinobacter*, *Mixta*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Thauera*, que pueden hacer el proceso de desnitrificación parcial ( $NO_3^-$ ) a nitritos ( $NO_2^-$ ). Adicionalmente, existen géneros como: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *sporolactobacillus*, *Staphylococcus* y *Zobellella*, que no llevan a cabo el proceso de desnitrificación debido posiblemente a que no presentan las enzimas necesarias para dicho proceso.

Se logró determinar la relación existente entre el potencial desnitrificante y los diferentes ambientes, a partir de los cuales se aislaron los especímenes microbianos de la colección evaluada; la zona de volcanes de lodos presentó el mayor número de especímenes que tienen la capacidad de realizar el proceso de desnitrificación total (21), seguida por la zona de petróleo (2), y finalmente la zona de matos de carbón (1).

Los resultados de las pruebas bioquímicas dan información sobre los diferentes procesos metabólicos de cada uno de los microorganismos presentes en la colección bacteriana, dicha información podrá ser utilizada para investigaciones futuras o para la caracterización taxonómica de cada uno de los aislados de la colección. Esta información es importante para la curaduría de la colección, garantizar el mantenimiento y la permanencia de esta.

## 7. Recomendaciones

Se hace necesaria la implementación de otras pruebas de curación con el fin de dar robustez a la colección y a partir de estas buscar soluciones a las diferentes problemáticas que afectan a los ecosistemas de la región.

Es necesario identificar al nivel de especie cada uno de los aislados bacterianos de la colección para corroborar la información suministrada por las diferentes pruebas de curación y así iniciar nuevas investigaciones.

Dado que existen aislados que tienen la capacidad de reducir los compuestos nitrogenados como los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), hasta nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) es necesario utilizar pruebas adicionales que permitan corroborar dicha producción de nitrógeno atmosférico, esto con el fin de obtener microorganismos de la colección que sean modelo para implementación de procesos de biorremediación.

### Referencias Bibliográficas

- Ahn, Y.-H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41(8), 1709–1721.
- Albert, L. A. (1997). Nitratos y nitritos. En *Introducción a la Toxicología ambiental*. México. (cap. 17).
- Almazán, X. A., Coma, S. C., Coda, F. E., & Pujol, R. O. (2002). Desnitrificación de un agua residual mediante resinas de intercambio iónico. *Ingeniería química*, (394), 414–424.
- Avery, A. A. (1999). Infantile methemoglobinemia: reexamining the role of drinking water nitrates. *Environmental health perspectives*, 107(7), 583–586.
- Boyer, E. W., Howarth, R. W., Galloway, J. N., Dentener, F. J., Green, P. A., & Vörösmarty, C. J. (2018). Riverine nitrogen export from the continents to the coasts. *Global Biogeochemical Cycles*. [https://doi.org/10.1029/2005GB002537@10.1002/\(ISSN\)1944-9224.GNEWS1](https://doi.org/10.1029/2005GB002537@10.1002/(ISSN)1944-9224.GNEWS1)
- Braker, G., & Conrad, R. (2011). Chapter 2 - Diversity, Structure, and Size of N<sub>2</sub>O-Producing Microbial Communities in Soils—What Matters for Their Functioning? En A. I. Laskin, S. Sariaslani, & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 75, pp. 33-70). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387046-9.00002-5>

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H., & Tiedje, J. M. (2000). Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, *66*(5), 2096–2104.
- Cabrera, M. L. (2007). Mineralización y Nitrificación: Procesos claves en el ciclo del Nitrógeno. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, *34*, 1–9.
- Capone, D. G., Popa, R., Flood, B., & Neelson, K. H. (2006). Follow the nitrogen. *Science*, *312*(5774), 708–709.
- Castro-González, M. (2014). Evaluación de la comunidad desnitrificante *nosZ* en la columna de agua de Isla del Sol, embalse de Prado, Tolima. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *38*(149), 385–392.
- Correa, D. (2016). *Biodiversidad y ecología funcional de bacterias desnitrificantes* (Tesis doctoral). Universidad de granada, Granada, España.
- Darrigran, G. (2012). Las Colecciones Biológicas: ¿ para qué? *Boletín Biológica*, *23*, 28–31.
- de Mesa, J. L. B. L., Quintero, G. M., & Ortiz, O. L. O. (2006). Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla en la Laguna de Tota, Boyacá, Colombia. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*, *4*(6), 50–54.
- Delgadillo, I., & Góngora, F. (2009). Colecciones Biológicas: Estrategias didácticas en la enseñanza-aprendizaje de la Biología.(pág. 131-140). *Bio-grafía Escritos sobre la biología y su enseñanza*, *2*(3), 131–140.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

- Diaz, R. J., & Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *science*, 321(5891), 926–929.
- Fan, X., Yu, H., Wu, Q., Ma, J., Xu, H., Yang, J., & Zhuang, Y. (2016). Effects of fertilization on microbial abundance and emissions of greenhouse gases (CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O) in rice paddy fields. *Ecology and evolution*, 6(4), 1054–1063.
- Flores, A. L. (2005). *Bacterias diazotroficas y desnitrificantes asociadas a raíces del mangle negro: Caracterización de las comunidades a nivel molecular y su producción de moléculas señal tipo acilo homoserina lactonas* (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México.
- Garzón-Zúñiga, M. A. (2005). Mecanismos no convencionales de transformación y remoción del nitrógeno en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Ingeniería Hidraulica En Mexico*, 20(4), 137–149.
- González Gil, D. M., & Jiménez Quiceno, J. N. (2013). *Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación*.
- Harter, J., El-Hadidi, M., Huson, D. H., Kappler, A., & Behrens, S. (2017). Soil biochar amendment affects the diversity of *nosZ* transcripts: implications for N<sub>2</sub>O formation. *Scientific reports*, 7(1), 3338.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(8), 5181–5189.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

- Herrera, O. F., Vargas, O. Y., & Marín, C. P. (2000). La contaminación ambiental por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados en el cultivo del tomate. *Scientia gerundensis*, (24), 5–12.
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., & Hallin, S. (2008). Phylogenetic Analysis of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide Respiratory Enzymes Reveal a Complex Evolutionary History for Denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1955-1966.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn146>
- Kokoschka, S., Dreier, A., Romoth, K., Taviani, M., Schäfer, N., Reitner, J., & Hoppert, M. (2015). Isolation of anaerobic bacteria from terrestrial mud volcanoes (Salse di Nirano, Northern Apennines, Italy). *Geomicrobiology Journal*, 32(3-4), 355–364.
- Lin, Y.-T., & Shieh, W. Y. (2006). *Zobellella denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Zobellella taiwanensis* sp. nov., denitrifying bacteria capable of fermentative metabolism. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(6), 1209–1215.
- MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas de reducción de nitratos/nitritos. En *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3.<sup>a</sup> ed.). Ed. Médica Panamericana.
- Meslé, M., Dromart, G., & Oger, P. (2013). Microbial methanogenesis in subsurface oil and coal. *Research in microbiology*, 164(9), 959–972.
- McGuirl, M. A., Nelson, L. K., Bollinger, J. A., Chan, Y.-K., & Dooley, D. M. (1998). The nos (nitrous oxide reductase) gene cluster from the soil bacterium *Achromobacter*

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

- cycloclastes: Cloning, sequence analysis, and expression. *Journal of inorganic biochemistry*, 70(3-4), 155–169.
- Munch, J. C., & Velthof, G. L. (2007). Chapter 21 - Denitrification and Agriculture. En H. Bothe, S. J. Ferguson, & W. E. Newton (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. 331-341). <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50022-9>
- Muñoz, H., Armienta, M. A., Andrea, V., & Cenicerros, N. (2011). Nitrato en el agua subterránea del Valle de Huamantla, Tlaxcala, México. *Revista Internacional de contaminación ambiental*, 20(3), 91–97.
- Niemann, H., Lösekann, T., Beer, D. de, Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K., Amann, R., Sauter, E. J., Schlüter, M., Klages, M., Foucher, J. P., & Boetius, A. (2006). Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature*, 443(7113), 854-858. <https://doi.org/10.1038/nature05227>
- Pérez-Peláez, N., Peña-Varón, M., & Sanabria, J. S. J. (2011). Comunidades bacterianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en humedales construidos. *Ingeniería y Competitividad*, 13(2).
- Ravindran, S. (2017). Inner Workings: Bacteria work together to survive Earth's depths. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(5), 788-790. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621079114>

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

R Development Core Team. (2010). R: A language and environment for statistical computing. R

Foundation for Statistical Computing [programa de ordenador] R version 2.11.1.

Rincón, L. E. C., & Gutiérrez, F. A. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285–295.

Rodríguez, J. G. M., Castellanos, Z., González, M. R., Hernández, G. N., & Contreras, R. F. (2006). Contaminación por nitratos en acuíferos del norte de México y del Estado de Guanajuato. *Agrofaz: publicación semestral de investigación científica*, 6(3), 379-388.

Scholten, E., Lukow, T., Auling, G., Kroppenstedt, R. M., Rainey, F. A., & Diekmann, H. (1999). *Thauera mechernichensis* sp. Nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 1045-1051. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1045>

Simmons, J. E., & Muñoz-Saba, Y. (2005). *Cuidado, manejo y conservación de las colecciones biológicas*. Univesidad Nacional de Colombia.

Simon, J., van Spanning, R. J. M., & Richardson, D. J. (2008). The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(12), 1480-1490. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.09.008>

Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2*. Williams & Wilkins.

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

Sutton, M. A., Howard, C. M., Erisman, J. W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., ...

Grizzetti, B. (2011). *The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives*. Cambridge University Press.

Yin, C., Fan, F., Song, A., Cui, P., Li, T., & Liang, Y. (2015). Denitrification potential under different fertilization regimes is closely coupled with changes in the denitrifying community in a black soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(13), 5719–5729.

Zumft, W. G., & Kroneck, P. M. H. (2006). Respiratory Transformation of Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O) to Dinitrogen by Bacteria and Archaea. En R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 52, pp. 107-227). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)52003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)52003-X)

## EVALUACION DE LA CAPACIDAD DESNITRIFICANTE