

**ADAPTACIÓN DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO DE VIDA
LIBRE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SALES DE AMONIO**

MAYRA ALEJANDRA GONZÁLEZ CASTILLO

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

2019

**ADAPTACIÓN DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO DE VIDA
LIBRE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SALES DE AMONIO**

MAYRA ALEJANDRA GONZÁLEZ CASTILLO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERA SANITARIA Y AMBIENTAL**

DIRECTORA

PhD JANETH SANABRIA GOMEZ

CODIRECTORA

CLAUDIA LORENA RODRIGUEZ GONZALEZ

UNIVERSIDAD DEL VALLE

SEDE MELÉNDEZ

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL MEDIO AMBIENTE
PROGRAMA ACADEMICO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL**

SANTIAGO DE CALI

2019

DEDICATORIA

Especialmente dedico este trabajo a mi madre, quien con su esfuerzo y dedicación procuro brindarme la mejor educación y crianza, para formarme como profesional y persona.

A mi familia que de una u otra forma ha estado presente durante este proceso con su motivación, apoyo incondicional y entrega.

A las amistades construidas en mi recorrido por la Universidad del Valle.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su acompañamiento y compromiso durante la carrera. Agradezco a la Universidad del Valle y al programa de Ingeniería Sanitaria y Ambiental por darme las herramientas necesarias para formarme como profesional.

A la profesora Janeth Sanabria por brindarme la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación GAOX y proporcionar los elementos necesarios para realizar mi trabajo de grado.

A Dany Acevedo y Claudia Rodríguez por su apoyo y acompañamiento durante este trabajo, y por brindarme los conocimientos necesarios en los diferentes temas que fueron requeridos.

Al grupo de investigación por sus aportes y apoyo a lo largo de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
2. ANTECEDENTES	3
3. OBJETIVOS	5
3.1 OBJETIVO GENERAL	5
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4. MARCO TEÓRICO	6
4.2 REACTORES SECUENCIALES EN BATCH (SBR)	6
4.3 FIJACIÓN DE NITRÓGENO	8
4.3.1 Fijación Biológica de Nitrógeno	8
4.3.2. Complejo enzimático nitrogenasa	9
4.3.3. Microorganismos fijadores de Nitrógeno de vida libre	9
4.3.4. Resistencia microbiana a la salinidad	10
4.4 DEGRADACIÓN DEL SUELO	11
4.4.1 Degradación del suelo por salinidad	13
4.4.2 Salinidad en el suelo	13
4.4.4 Naturaleza de las sales solubles	15
4.5 ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS SALINOS	15
4.5.1 Lavado	15
4.5.2 Remediación con la utilización del yeso	16
4.5.3 Biorremediación	16
4.6 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA	17
4.7 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU	19
5. MÉTODOS	20

5.1 INOCULOS SELECCIONADOS	20
5.2 FASE 1: Reactivación del crecimiento de inóculos.	20
5.3 FASE 2: Adaptación a condiciones salinas	22
5.4 SEGUIMIENTO DEL PROCESO	24
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	25
6.1 FASE 1. REACTIVACIÓN DEL CRECIMIENTO DE INOCULOS	25
6.2 FASE EXPERIMENTAL 2: CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO	30
6.3 PRUEBAS DE DETECCIÓN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA	35
7. CONCLUSIONES	39
8. RECOMENDACIONES	40
9. BIBLIOGRAFÍA	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de funcionamiento de un reactor SBR	7
Figura 2. Procesos de degradación de suelos	12
Figura 3. Etapas de un ciclo de operación de los reactores que fueron inoculados con suelo y lodo.....	21
Figura 4. Montaje de reactores con sus réplicas.....	22
Figura 5. Promedio del cambio entre las concentraciones de biomasa en los reactores (RL y RS) al inicio y final de los ciclos de la fase de renovación del crecimiento de inóculos	25
Figura 6. Promedio del cambio entre las concentraciones de Amonio de los dos reactores (RL y RS) al inicio y final de los ciclos de la fase de renovación de los inóculos	27
Figura 7. Promedio del cambio entre las concentraciones de nitratos de los dos reactores (RL y RS) al inicio y final de los ciclos de la fase de renovación de los inóculos	27
Figura 8. Densidad poblacional de los reactores RL y RS presente en tres medios de cultivos al inicio y al final de la fase de renovación de inóculos.....	29

*UFC: Unidades Formadoras de Colonias, RBA: Medio selectivo para diazotrofos, EMB: Methylene Blue Agar	29
Figura 9. Ciclo del nitrógeno.....	30
Figura 10. Cambio entre las concentraciones de amonio al inicio y final de los ciclos de operación de los reactores RL y RS de la Fase de condiciones de estrés salino	31
Eje horizontal: Concentraciones de amonio añadidas al medio cada semana.....	31
Figura 11. Concentraciones de nitratos al inicio y final de los ciclos de operación en RL y RS de la Fase de condiciones de estrés salino	32
Eje horizontal: Concentraciones de amonio añadidas al medio cada semana.....	32
Figura 12. Concentración de biomasa al inicio y final de los ciclos de operación de los reactores RL y RS de la fase de condiciones de estrés salino	33
Figura 13. Densidad poblacional de los reactores RL y RS presente en dos medios de cultivo al final de los ciclos de la Fase de condiciones de estrés salino	34
*RBA: Medio selectivo para diazótrofos, EMB: Methylene Blue Agar.....	34
Figura 14. Micrografía de FISH tomada con microscopio Nikon 90i de (A) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 al inicio de la fase experimental I del reactor de lodo y (B) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 con concentraciones de 250mg/L N en el reactor y (C) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 al final de la fase experimental II.	37
Figura 15. Micrografía de FISH tomada con microscopio Nikon 90i para reactor de suelo (A) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 al inicio de la fase experimental I (B) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 con concentraciones de 250mg/L N en el reactor (C) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 al final de la fase experimental II.	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de salinidad del suelo para el Valle del Cauca. (CVC, 2015).....	14
Tabla 2. Interpretación de pruebas bioquímicas.....	17
Tabla 3. Condiciones de operación de los reactores en la Fase 1.	20
Tabla 4. Composición del medio RBA para los reactores	21
Tabla 5. Concentraciones de amonio y conductividad eléctrica del sulfato de amonio utilizadas en la segunda fase de experimentación	23
Tabla 6. Condiciones de operación para los reactores en la fase 2	23
Tabla 7. Pruebas bioquímicas aplicadas a colonias aisladas de lodo y de suelo	35

RESUMEN

La Fijación de Nitrógeno es considerada uno de los puntos clave de investigación para la sostenibilidad global en el planeta. Por tanto buscar alternativas sustentables es una prioridad mundial. La adaptación a condiciones de estrés salino puede afectar negativamente las bacterias nativas del suelo y limitar el desarrollo de las plantas y la calidad del suelo. Se realizó la selección y la adaptación de comunidades microbianas fijadoras de Nitrógeno provenientes de suelo y de lodos de tratamientos industriales. En Reactores Secuenciales en Batch (SBR). Un primer reactor se inoculó con lodos obtenidos de un Sistema de Tratamiento de Agua Residual de la industria de las levaduras (RL), el segundo reactor se inoculó con un suelo de vocación agrícola del Valle del Cauca (RS). Ambos reactores se alimentaron con un medio libre de nitrógeno para reactivar el crecimiento de los inóculos. Una vez reactivados los inóculos se sometieron a concentraciones definidas de sales para verificar su resistencia al estrés salino. El reactor RS presentó mayores densidades de BFN ($2,8E+06 \text{ UFC.mL}^{-1}$) para la fase de enriquecimiento. Al final de la fase de adaptación el reactor RL presentó densidades de BFN $4,6E+07 \text{ UFC.mL}^{-1}$ y el reactor RS de $4,9E+07 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el experimento sugieren este tipo de inóculos como una alternativa para la recuperación de suelos degradados por salinidad.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes para la vida, es necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos, (Cerón & Aristizábal, 2012). En su forma molecular (N_2) el nitrógeno representa el 78% de los gases que componen la atmósfera, y es la única reserva natural accesible de nitrógeno. Sin embargo, esta fuente no es asimilable por los organismos presentes en el suelo (Philippot & Germon, 2005).

Ningún organismo eucariota es capaz de asimilar el nitrógeno atmosférico por sí mismo. Los microorganismos procariotas tienen la capacidad de transformar el nitrógeno molecular a la forma asimilable de amonio ya que tienen el complejo enzimático nitrogenasa que es el encargado de reducir el nitrógeno atmosférico en amonio en un proceso llamado Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Mantilla-Paredes et al., 2009). Estos microorganismos pueden vivir libremente en el suelo o vivir simbióticamente con determinadas plantas (principalmente leguminosas), contribuyen al uso eficiente de los nutrientes y productividad del suelo.

Buscando satisfacer las demandas de producción alimenticia mundial, es esencial el uso de fertilizantes químicos nitrogenados (Danso & Eskew, 2005). Aproximadamente el 40% de la agricultura mundial depende del uso de fertilizantes químicos (Cherkasov et al, 2015) y se producen alrededor de 500 Mton por año (Engel & Reid, 2007). La síntesis industrial de estos se lleva a cabo en un proceso que demanda altas cantidades de energía y presión llamado Haber-Bosch. Los fertilizantes nitrogenados de síntesis (nitrato amónico-cálcico, nitrato amónico, nitro sulfato amónico, sulfato amónico, entre otros) se obtienen utilizando como fuente básica el amoniaco, obtenido a su vez por el proceso de Haber Bosch. Las elevadas temperaturas y presiones requieren del consumo del 2% de los suministros mundiales de energía. La producción de fertilizantes químicos emite más de 400 Mt.año^{-1} de CO_2 , lo que conlleva un 1,6% de las emisiones totales de CO_2 , contribuyendo al efecto invernadero del planeta (Hernández, 2011). El uso de fertilizantes químicos por la planta no es eficiente, entre el 30 y 50% del nitrógeno es aprovechado por los cultivos (Wang et al, 2014), perdiéndose el resto por procesos de volatilización y lixiviación. Estas pérdidas se asocian a problemas ambientales como la

eutrofización de los ecosistemas acuáticos, con ello lleva a la proliferación de algas, anoxia del agua, muerte de peces y pérdidas de biodiversidad. El incremento de las concentraciones de derivados nitrogenados (NO_x y NH_3), aumento de la concentración de ozono a nivel del suelo y material particulado ($\text{PM}_{2,5}$) que puede incrementar la probabilidad de enfermedades cardiovasculares y respiratorias y cánceres mortales.

La aplicación de fertilizantes nitrogenados y la deposición atmosférica de nitrógeno reactivo causa acidificación de los suelos, lo cual supone una reducción del crecimiento de los bosques y cultivos e incrementa el arrastre de componentes que afectan la calidad del agua, como los metales pesados. Participan también al incremento de persistencia de plagas generando un círculo vicioso de dependencia creciente de los cultivos frente a estos productos. De hecho, los expertos estiman que, en la actualidad, el nitrógeno de la síntesis Haber-Bosch se encuentra presente por lo menos en el 30% del cuerpo humano (Estupiñán & Quesada, 2010). El remanente que se deposita en el suelo, ocasiona salinidad e inhibición de la FBN y el deterioro de la calidad del suelo. (Mulas et al, 2011).

En 2010, fue publicado el primer informe europeo sobre nitrógeno. *The European Nitrogen Assessment* (ENA), y la comunidad científica se refirió por primera vez a la síntesis Haber - Bosch como una amenaza para la humanidad (Estupiñán & Quesada, 2010). Un informe Elaborado por la FAO (2015) muestra un incremento del 1,8% en el uso de fertilizantes a nivel mundial por año, hasta alcanzar en 2018 los 200,5 Mton de fertilizante. En el caso de Colombia, en la década de los años 80, el uso de fertilizantes se incrementó en más del 80%. A partir de ese momento la calidad del suelo se vio afectada por la práctica extensiva e inadecuada de la agricultura, en especial del monocultivo (Jiménez & Thomas, 2003).

Los suelos susceptibles a la salinización en Colombia cubren una extensión de 86.592Km² de los cuales 78.277 Km² están en zonas secas, es decir el 90,39% (Zúñiga et al, 2011). Las zonas susceptibles a la salinización abarcan gran parte de la región del caribe, los valles interandinos (ríos Magdalena y Cauca) y los altiplanos donde se desarrollan actualmente y se tiene proyectado ampliar la producción agrícola del país. En el Valle del Cauca son destinados a cultivo 156.372 Has (secretaria de agricultura y pesca, 2008) y debido al uso de fertilizantes y pesticidas se ha generado un incremento en la ocurrencia de suelos salinos y sódicos (Guerrero, 1995), por lo que es indispensable adoptar medidas preventivas para garantizar la calidad de los suelos, no solo en el Valle del Cauca, sino en otras zonas donde las condiciones pueden ser similares. Por eso, existe la necesidad de que se complemente el uso de fertilizantes nitrogenados con otro tipo de inóculos, enmiendas y tecnologías.

De las alternativas utilizadas hasta el momento se encuentran: Inoculación microbiológica en suelos salinos, lavado, biopolímeros, electromagnetismo, entre otras. Estas metodologías tienen la desventaja de exigir un manejo más cuidadoso o de causar otro tipo de daños al suelo. Por otra parte, se ha demostrado que en los sistemas de tratamiento de agua residual se encuentran Bacterias Fijadoras de Nitrógeno - BFN (Pérez-Peláez, Peña-Varón, & Sanabria, 2011). La característica interesante de estos sistemas es que tienen altas concentraciones de salinidad, y amonio. Por lo cual, los microorganismos allí presentes ya están adaptados a estas condiciones ambientales. La extracción de estos microorganismos, su enriquecimiento en ambientes controlados y adaptación a altas concentraciones de sales de amonio podría ser una potencial alternativa complementaria para la producción de nuevo bioinoculantes y por ende la

recuperación de suelos degradados por salinidad. Por lo tanto, este trabajo de investigación busca seleccionar y enriquecer microorganismos fijadores de nitrógeno adaptados al estrés salino, presentes en dos tipos de muestras, utilizando reactores biológicos de tipo SBR. Sentando así las bases para la obtención de un biofertilizante alternativo a la fertilización química.

2. ANTECEDENTES

En el siglo XVIII, la fertilización de las tierras se llevaba a cabo mediante la rotación de los cultivos y la adición de guano, un sustrato resultante de la acumulación masiva de excrementos de murciélagos, aves marinas y focas. Cerca del año 1800 inició un incremento exponencial de la población, vinculado principalmente al mejoramiento de las condiciones sanitarias y alimentarias, exigiendo una mayor producción agrícola y trabajo intensivo del suelo, lo que impulsó el desarrollo de fertilizantes nitrogenados químicos. La creación del primer fertilizante nitrogenado por medio de la reducción química del nitrógeno atmosférico fue desarrollada en Noruega por los ingenieros Kristian Birkeland y Sam Eyde a partir del uso de un arco eléctrico con un potente campo magnético o lo que se conoce como el proceso Birkeland-Eyde (Santilla, 2003). Pero este proceso es ineficiente debido a su consumo de energía, de más de 78 GJ (López, 2017), por lo que en 1909 fue reemplazado con el proceso Haber-Bosch.

Alternativo a la producción de fertilizantes químicos se ha buscado otras fuentes de nitrógeno que entreguen los nutrientes al suelo para cubrir la demanda alimenticia de una manera más sustentable y económica. Investigaciones sobre la fijación simbiótica de nitrógeno, centran la atención sobre el sistema *Rhizobium*-leguminosa el cual constituye una importante alternativa para la producción agrícola de leguminosas, grano y forrajeras (Corrales et al, 2017). Es por esto que se investiga con base en el conocimiento de la diversidad y ecología de bacterias fijadoras de nitrógeno.

La producción de biofertilizantes en el mundo inició a finales del siglo XIX, a partir de los estudios realizados por Winogradsky, Waksman y Lipman, pioneros de la microbiología del suelo, al enfocarse en la investigación de microorganismos y su capacidad metabólica para degradar nutrientes importantes en la fertilización del suelo (Cuervo, 2010). La fijación del nitrógeno ha sido estudiada desde hace más de 100 años. En 1901, Beijerinck reporta la interacción de microorganismos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Klebsiella*, que lo fijan por asociación y algunos que forman simbiosis como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. En 1907, Ashby realizó estudios con *Azotobacter* en un medio libre de

nitrógeno, medianamente selectivo para bacterias fijadoras de éste, que permite el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno y que se conoce como medio Ashby (Portela et al, 2013).

Dentro de las metodologías de obtención de estos biofertilizantes, se han desarrollado aislados de suelos fértiles. Para la obtención de fijadores de nitrógeno se toman muestras del suelo y se enriquecen en medios líquidos/sólidos libres de nitrógeno, en los que se encuentran todas las sustancias necesarias para el crecimiento de los microorganismos, con el fin de que el aumento de biomasa sea solo de organismos capaces de fijar nitrógeno. Con procesos como la prospección de la biodiversidad, se identifican y caracterizan microorganismos que pueden ser aprovechados para la producción de biofertilizantes (Duarte, 2016).

Así mismo, dentro de la trayectoria del grupo de Investigación de Procesos Avanzados de Oxidación de la Universidad del Valle (GAOX) en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología ambiental, se han realizado estudios donde se demostró la presencia de inóculos diazótrofos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas en altas concentraciones de amonio (Pérez-Peláez, Peña-Varón, & Sanabria, 2011). También se llevó a cabo el enriquecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre provenientes de Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas (STARD), concluyendo que los inóculos provenientes sistemas de lodos activados son un potencial de biofertilizante como alternativa a la recuperación de suelos degradados por salinidad y altas concentraciones de amonio, (Rodríguez, C, 2014). Se ha evaluado la biofertilización de nitrógeno en suelos salinos a partir de consorcios microbianos obtenidos de STARD, con el fin de encontrar y cultivar a escala de laboratorio, organismos fijadores de nitrógeno de vida libre y evaluar la recuperación de FBN en un suelo degradado por salinidad. (Rodríguez, O.M, 2014).

De manera más reciente (2017) se realizó el estudio de una alternativa a escala de laboratorio para la producción de amonio y biomasa activa fijadora de nitrógeno a partir de una mezcla de inóculos proveniente de sistemas de tratamiento de aguas residuales, además de la determinación del modelo cinético del comportamiento de los microorganismos. (Arroyo, 2017). Finalmente, estos inóculos fueron probados como una alternativa a la fertilización química en cultivos de albahaca a escala de invernadero, donde se obtuvieron resultados promisorios de reducciones de uso de fertilizante del 75% (Sarria 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Seleccionar y adaptar microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en suelos intervenidos y agua residual, a altas concentraciones de sales de amonio, como alternativa de obtención de biofertilizantes resistentes a condiciones de suelo degradado por salinidad.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enriquecer los inóculos de microorganismos fijadores de nitrógeno pertenecientes a un lodo de un sistema de tratamiento de aguas residuales y un suelo intervenido.
- Adaptar los inóculos de microorganismos fijadores de nitrógeno pertenecientes a un suelo intervenido y un lodo de un sistema de tratamiento de aguas residuales a condiciones de altas concentraciones de sales de amonio.
- Comparar la adaptación entre los inóculos estudiados en diferentes fases del experimento, utilizando técnicas dependientes y no dependientes de cultivo.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 ADAPTACIÓN MICROBIANA

Proceso biológico que ocurre cuando un cambio en el ambiente induce la expresión de un rasgo alternativo no heredable, (ej. modificación de elementos constituyentes y de la organización estructural) lo que proporciona a los microorganismos la capacidad para ajustarse a las nuevas condiciones (Ocaña et al, 2010). La adaptación está limitada por la constitución genética; solo los microorganismos que tengan el mejor genotipo pueden sobrevivir. Una mutación es un cambio heredable del genotipo, que causa un cambio permanente del individuo, llamado mutante. Si es capaz de prosperar bajo las condiciones ambientales de su entorno, el mutante se perpetuara, de lo contrario perecerá. La mutación se puede producir de manera espontánea o por transferencia genética con otros microorganismos mediante los procesos de transformación, transducción o conjugación (Betancur et al, NA).

4.2 REACTORES SECUENCIALES EN BATCH (SBR)

Un reactor discontinuo secuencial (SBR) se puede definir como un sistema cuyo funcionamiento se basa en la secuencia de llenado y vaciado. Los procesos unitarios que intervienen son similares a los de un proceso convencional de lodos activados. En ambos sistemas intervienen la mezcla, reacción y sedimentación, pero entre ambos existe una diferencia importante, ya que, en las plantas convencionales, los procesos se llevan a cabo simultáneamente en tanques separados, mientras que en un sistema SBR los procesos tienen lugar en el mismo tanque (Paredes et al, 2014). La configuración del ciclo depende de las características del agua residual y los requisitos legales a cumplir, y sigue fundamentalmente las siguientes etapas que pueden observarse en la Figura 1.

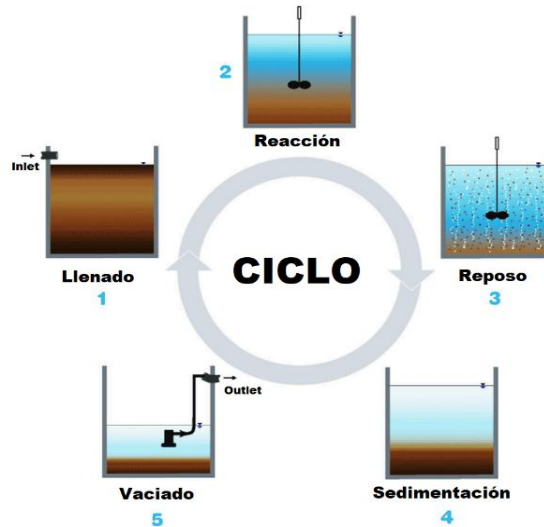


Figura 1. Ciclo de funcionamiento de un reactor SBR

Fuente Absun Palayesh, 2018

Etapas de llenado: El reactor es llenado con medio fresco, donde tiene todos los micro y macro nutrientes necesarios para el crecimiento celular, esta etapa puede ser estática, mezclada o aireada. En el llenado estático resulta una entrada mínima de energía y una concentración alta de sustrato al final de la misma. En lodos activados puede presentarse desnitrificación con la presencia de nitratos y generar condiciones propicias para la remoción del fósforo. Con respecto al llenado aireado, se genera al comienzo de las reacciones aerobias y mantiene bajas concentraciones de sustrato, situación importante cuando existen elementos tóxicos en el agua residual.

Etapas de reacción: Es el tiempo en donde ocurren las transformaciones químicas, generalmente se proveen condiciones de mezcla, en las que se permite el consumo de sustrato en condiciones ambientales controladas que pueden ser oxicas, anóxicas o microarofilas, favoreciendo diferentes tipos de metabolismos.

Etapas de sedimentación: La aireación y mezcla son detenidas para separar la biomasa del medio. Su objetivo es la regulación de la concentración de sólidos en el reactor. Los sólidos se dejan separar del líquido en condiciones de quietud, lo que resulta en un sobrenadante clarificado que puede ser descargado como efluente. El tiempo de asentamiento puede durar entre 0,5 y 1,5 h, en

lodos activados se usa para prevenir que el manto de sólidos flote debido a la acumulación de gas.

Etapas de vaciado: el sobrenadante clarificado se descarga del reactor como efluente. El exceso de lodo activado residual también se remueve, empleando un tiempo que puede variar desde un 5 a un 30 % del tiempo total. El proceso llevado a cabo en un SBR puede ofrecer muchas características ventajosas para aplicaciones en investigación: el control de las condiciones de funcionamiento es más fiable, preciso y versátil.

Estas secuencias de pasos, permite a los microorganismos la adaptación a un tipo de sustrato o medio de cultivo, consigue la degradación de la materia orgánica y la eliminación de nutrientes, como el nitrógeno.

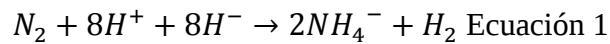
4.3 FIJACIÓN DE NITRÓGENO

La fijación de nitrógeno es el proceso a través del cual, microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetos reducen el nitrógeno hasta una forma accesible para el crecimiento de las mismas (Figuerola, 2004). La Fijación de nitrógeno puede darse de manera abiótica o biológica. A partir de la primera opción se forman óxidos por consecuencia de la combustión de compuestos orgánicos y descargas eléctricas, los cuales posteriormente son arrastrados en el suelo por la precipitación. Por otro lado, se da por Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), por descargas eléctricas (rayos) o de forma artificial para la fabricación de fertilizantes, por medio del proceso Haber Bosch (Travers, 2007).

4.3.1 Fijación Biológica de Nitrógeno

La FBN es una capacidad metabólica presente en muchas procariotas (*Eubacteria* y *Arquea* y cianobacterias); se realiza por medio de la enzima nitrogenasa responsable de reducir los triples enlaces de la molécula de N_2 a NH_4^+ (Ecuación 1), que le permita incorporarse a la biósfera, el complejo de la enzima nitrogenasa tiene dos co-proteínas, una que contiene hierro y molibdeno, y otra que solamente contiene hierro. Para el funcionamiento de la nitrogenasa se requiere de grandes cantidades de ATP y se inactiva en presencia de oxígeno (Travers, 2007). Este proceso naturalmente es altamente consumidor de energía, por esta razón el triple enlace formado para

unir a los dos átomos de nitrógeno es duro de romper y el trabajo que desempeña la nitrogenasa implica el consumo de 16 moléculas de ATP por cada molécula de N reducido.



La cantidad potencial de nitrógeno fijado por estas bacterias depende en gran medida del ecosistema en el que los organismos son activos. Se destacan organismos anaerobios, microaerobio, aerobios, así como también organismos con capacidad fotosintética y metanogénica entre otros (Estrada, 2008).

4.3.2. Complejo enzimático nitrogenasa

Enzima proteica encargada de realizar la ruptura del enlace de N_2 y la adición de tres átomos de hidrógeno a cada átomo de nitrógeno (Wagner, 2012). La misma está compuesta por dos proteínas solubles o metaloproteínas: la proteína del hierro o ferroproteína (dinitrogenasa reductasa) y la proteína del MoFe o molido ferro proteína (dinitrogenasa). El MoFe es un cofactor esencial en la dinitrogenasa. Las dos enzimas del complejo funcionan conjuntamente: la dinitrogenasa reductasa reduce la dinitrogenasa, mientras que esta última reduce el nitrógeno. Ambas enzimas son necesarias para que se produzca la fijación. Cada electrón transferido requiere 2 ATP, como es necesario transferir cuatro pares de electrones por cada molécula de nitrógeno reducido, el balance final de consumo es de 16 ATP. La fuente primaria de energía y poder reductor es la sacarosa, un disacárido formado por una molécula de glucosa y otra de fructosa originada en el proceso fotosintético (Calvo, 2011).

4.3.3. Microorganismos fijadores de Nitrógeno de vida libre

En su mayoría las bacterias fijadoras de nitrógeno, no están asociadas a plantas o animales. Estas viven libres en el suelo o el agua y fijan nitrógeno para su propio beneficio, de estas bacterias de vida libre, las cianobacterias son las más conocidas dentro del ámbito agrícola. Las especies bacterianas de vida libre más ampliamente estudiadas pertenecen al filo de las proteobacterias, del orden de las pseudomonales y de las enterobacterias y son; *Azotobacter vinelandii* (aerobio obligado), *Klebsiella pneumoniae* (anaerobio facultativo), *Clostridium pasteurianum* (anaerobio

obligado), *Rhodobacter capsulatus* (bacterias fotosintéticas) y varias especies de *Anabaena* y *Nostoc* (cianobacterias formadoras de heteroquistes). El nitrógeno fijado por estos organismos solo llega a ser disponible para el ecosistema circundante, generalmente cuando la bacteria muere (Fisher & Newton, 2002).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, son frecuentes en todo tipo de suelo y se encuentran principalmente en la rizosfera de las plantas superiores. Pueden ser heterótrofas, cuando utilizan como fuente de energía (carbono orgánico) restos vegetales o, autótrofas, cuando son capaces de obtener el carbono del CO₂ atmosférico, mediante la fotosíntesis. También se presentan organismos aeróbicos y anaeróbicos en este grupo de fijadores. (Orozco, 1999) Según Rodríguez (2009), entre las bacterias fijadoras libres, las más numerosas y eficaces son las aeróbicas.

4.3.4. Resistencia microbiana a la salinidad

Los ambientes salinos naturales son acuáticos o terrestres. Estos poseen una microflora nativa, la cual es pieza clave para los ecosistemas. Los ambientes salinos poseen una diversidad de grupos bacterianos, los cuales poseen adaptaciones evolutivas en su plano fisiológico y estructural, que les permite sobrevivir a estas condiciones extremas. Las bacterias halófilas obligadas sólo pueden desarrollarse en una concentración de 1,5 M de NaCl equivalentes. Asimismo, toleran bien las altas temperaturas, ya que los ambientes cálidos donde se desarrollan (suelos áridos y agua de lagunas endorreicas) pueden llegar a los 50 °C (Calderón, 2015)

Las bacterias halófilas se han definido como quimioheterótrofos, adaptándose a la disponibilidad de nutrientes que se encuentran en el medio. Pese a esto, se han registrado casos de bacterias halófilas que han fijado dióxido de carbono en un principio de fotosíntesis. La actividad de las bacterias halófilas involucra degradación de materia orgánica, fijación de nitrógeno y producción de metabolitos que son cedidos para otros microorganismos o para las plantas mismas (Castillo y Carvajal, 2011; Frioni, 2011).

Un ejemplo de hábitat para bacterias halotolerantes son los sistemas de tratamiento de agua residual. Estos lodos residuales, cuando no contienen sustancias tóxicas, pueden ser compostados

y ser usados para mejorar la calidad de los suelos y estimular a la población microbiana para que promueva la degradación de contaminantes orgánicos, ya que son ricos en materia orgánica, macro y micro nutrientes.

4.4 DEGRADACIÓN DEL SUELO

La degradación de los suelos y tierras se refiere a la disminución o alteración negativa de una o varias de las ofertas de bienes, servicios y/o funciones ecosistémicas y ambientales, ocasionada por procesos naturales o antrópicos que, en casos críticos, pueden originar la pérdida o la destrucción total del componente ambiental.

La degradación de los suelos puede ser física, química y biológica como se muestra en la Figura 2. En la degradación física se destaca la erosión y la compactación; y consiste en la pérdida físico-mecánica del suelo a causa del agua o del viento con daño en sus funciones y servicios ecosistémicos. En la degradación química se resalta la salinización de los suelos, la acidificación y la contaminación, debida en general al uso excesivo de riego y fertilizantes y como consecuencias de las actividades mineras e industriales. En la degradación biológica, el proceso de degradación más importante es la pérdida de materia orgánica, que influye en la disminución de la actividad biológica y en procesos de descomposición y mineralización. (IDEAM, 2015).

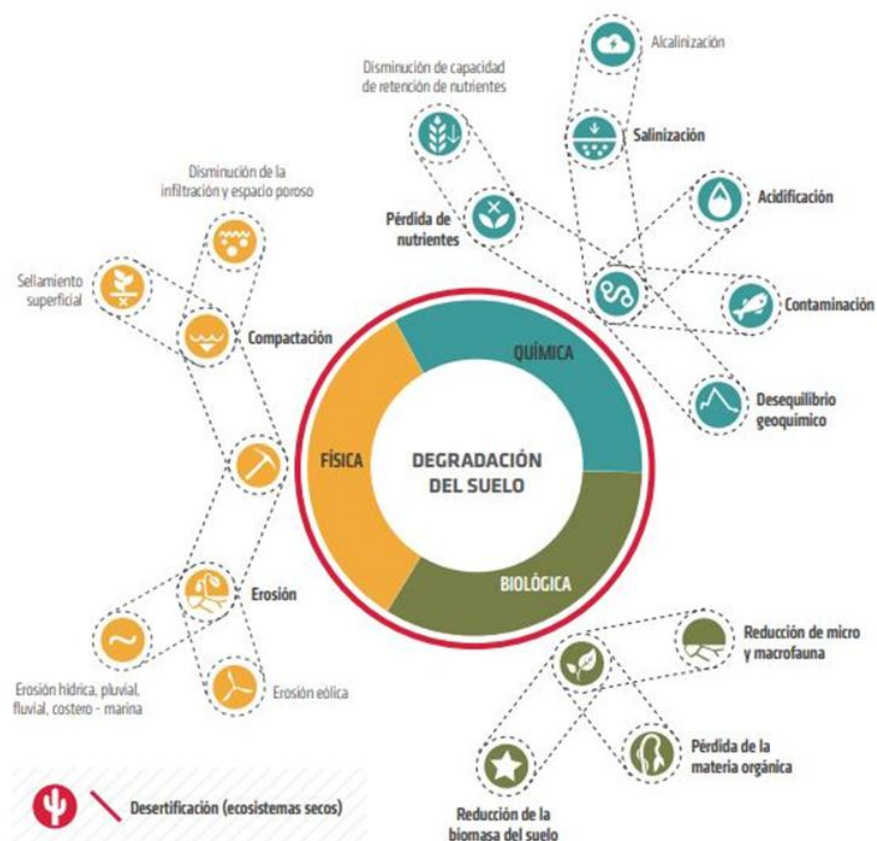


Figura 2. Procesos de degradación de suelos

Fuente: IDEAM, 2015

En muchas ocasiones la degradación es compleja, en la medida en que puede presentarse de forma física, química y biológica al mismo tiempo, o una de ellas puede ser el comienzo de otras. Cuando estas ocurren en tierras con climas secos se llama desertificación. Las causas de la degradación de los suelos y de sus servicios ecosistémicos pueden ser de diferente índole: social, económica, cultural y por amenazas naturales y seminaturales como son la variabilidad climática y el cambio climático, entre otras. Sin embargo, se puede afirmar en forma general, y de acuerdo con la política para la gestión sostenible del suelo, que las causas son el uso, manejo y gestión insostenible de los suelos del país, que a su vez tiene otras causas. Esta degradación afecta directamente la oferta de servicios ecosistémicos de los suelos, y con ello se genera la amenaza a la supervivencia humana

4.4.1 Degradación del suelo por salinidad

La salinización es proceso químico de origen natural o inducido por las actividades antrópicas. Corresponde al proceso de aumento, ganancia o acumulación de sales en el suelo, es decir, al incremento de la salinidad. Por lo general, el aumento de sales en el suelo y en concentraciones elevadas afecta las características fisicoquímicas y biológicas de los suelos y sus servicios ecosistémicos, entre ellos el desarrollo de las plantas, especialmente de cultivos y la biota edáfica. En consecuencia, se considera como un proceso de degradación de suelos (IDEAM et al, 2017).

4.4.2 Salinidad en el suelo

Se define como la concentración de sales totales en el suelo (se incluyen las sales en solución, intercambiables y poco solubles). El estado de salinidad de un suelo no indica por sí solo su origen, es decir, si es natural (primario o secundario) o antrópico. La medición de la salinidad se realiza con la conductividad eléctrica (CE) y sus relaciones con el contenido de bases intercambiables (Na, K, Ca, Mg) y de aniones. Para el estudio de la salinidad, los suelos se clasifican en salinos, sódicos y salino – sódicos (IDEAM et al, 2017).

La salinidad de un suelo puede cuantificarse a través de la medición de la conductividad eléctrica del líquido filtrado a partir del suelo saturado. Se emplea un conductímetro. Para determinar la conductividad se sumerge el conductímetro en el extracto del suelo, aquel establece un potencial eléctrico y las sales disueltas conducen la corriente eléctrica que es proporcional a su concentración. La conductancia media se asocia directamente con la concentración de las sales disueltas. Según el sistema internacional la unidad de conductividad es el Siemens (Pernasetti, 2010).

$$1S = 1 \text{ mhos, de manera que } 1 \frac{dS}{m} = 1 \frac{\text{mmhos}}{\text{cm}} \text{ Ecuación 2}$$

Dónde: S = (medida de la conductancia eléctrica)

dS/m = define la conductividad de un material; es inversa a la resistividad

Un suelo salino es aquel que contienen en la zona radicular una cantidad de sales disueltas en la solución del suelo elevada, Conductividad Eléctrica (CE) suficientemente alta para restringir el desarrollo de los cultivos. La reacción de estos suelos va de neutra a ligeramente alcalina. El pH puede variar entre 7 y menos de 8,5. El PSI (Porcentaje de Sodio Intercambiable) se mantiene por debajo de 7, por lo que la estructura no se ve afectada (CVC, 2015). La clasificación de los tipos de salinidad se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de salinidad del suelo para el Valle del Cauca. (CVC, 2015)

Definición	CE (Ds/m)	PSI
No salino – No sódico	0 - 2	> 15
No salino – ligeramente sódico	0 - 2	0 - 7
No salino – sódico	0 - 2	7 - 15
Ligeramente salino – No sódico	2 - 4	> 15
Ligeramente salino – ligeramente sódico	2 - 4	0 - 7
Ligeramente salino-sódico	2 - 4	7 - 15
Moderadamente salino – No sódico	4 - 8	> 15
Moderadamente salino – ligeramente sódico	4 - 8	0 - 7
Moderadamente salino – sódico	4 - 8	7 - 15
Fuertemente salino – No sódico	8 – 16	> 15
Fuertemente salino – ligeramente sódico	8 – 16	0 - 7
Fuertemente salino – sódico	8 – 16	7 - 15
Muy fuertemente salino – No sódico	> 16	> 15
Muy fuertemente salino – ligeramente sódico	> 16	0 - 7
Muy fuertemente salino – sódico	> 16	> 15

4.4.4 Naturaleza de las sales solubles

Las sales pueden encontrarse en dos estados: disueltas en solución dentro de los espacios disponibles en la estructura del suelo o precipitadas en forma de cristales. El contenido y los tipos de sales cambia de acuerdo a la humedad edáfica, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y el pH. Durante el periodo húmedo aumentan las sales en solución, disminuyen las cristalizadas y adsorbidas. Durante el periodo seco el comportamiento es inverso. Las sales más abundantes están formadas por cuatro cationes; de sodio, calcio, magnesio y potasio y cuatro aniones; cloruro, sulfato, carbonato y bicarbonato (Pernasetti, 2010).

4.5 ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS SALINOS

La recuperación de suelos salinos es esencialmente el proceso donde la solución de suelo con alta concentración de sales es reemplazada por otra menos salina. La concentración y los mecanismos de transporte de sales de la solución del suelo responden a mecanismos que controlan la eficiencia de la lixiviación. La eficiencia de la lixiviación se mide a partir de la cantidad de sales removida desde la zona de las raíces, y esta depende de la concentración de sales y la distribución en el suelo, la composición de los solutos, la estructura del suelo y los métodos de manejo de los sistemas de riego.

4.5.1 Lavado

El método más utilizado para la recuperación de suelos salinos es el lavado o la lixiviación de las sales solubles con agua de baja salinidad; este método consiste básicamente en aplicar una lámina grande de agua para disolver las sales y removerlas de la zona radical del cultivo. Aunque para lavar un suelo salino es indispensable que éste sea permeable y que exista una salida para el agua de drenaje, también la tolerancia del cultivo a establecer es importante. El método hidrotécnico consiste en manejar la cantidad y calidad química de las aguas disponibles para mantener las sales solubles y las intercambiables a un nivel que no afecten, directa o indirectamente, el desarrollo de los cultivos y, según Richards (1980), es el procedimiento más efectivo para eliminar el exceso de sales solubles del suelo (Serrato et al, 2002).

4.5.2 Remediación con la utilización del yeso

El yeso es un material que desde el punto de vista agronómico desempeña tres funciones en el tratamiento de suelos: mejoramiento, acondicionamiento y fertilización. El yeso que se utiliza en la agricultura es el fosfoyeso, que es un producto de la fabricación del ácido fosfórico a partir de rocas fosfatadas usando ácido sulfúrico. A nivel mundial la cantidad producida de fosfoyeso es superior a 150 millones de toneladas, lo que ha ocasionado en algunos países como España problemas de manejo sobre el impacto ambiental (Hernández, 2011).

4.5.3 Biorremediación

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (su capacidad de biodegradación) para limpiar terrenos o aguas contaminadas (Watanabe, 2001). También se puede definir como un grupo de tratamientos, contra la contaminación de un medio, que aplica sistemas biológicos para catalizar la destrucción o transformación de compuestos químicos en otros menos tóxicos (Atlas & Unterman, 1999; Hughes et al, 2000). Estos microorganismos utilizan su potencial enzimático para mineralizar los compuestos contaminantes o degradarlos hasta productos intermedios, en un ambiente aerobio o anaerobio. Existen factores limitantes (King et al, 1997) como son: nutrientes esenciales (nitrógeno y/o fósforo), aceptores adecuados de electrones, condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad), inexistencias de poblaciones microbianas con potencial enzimático.

4.6 ESTADISTICA DESCRIPTIVA

Rama de la estadística que formula recomendaciones de como resumir, de forma clara y sencilla, los datos de una investigación en cuadros, tablas, figuras o gráficos. El objetivo de las tablas o cuadros es proporcionar información puntual de los resultados. Las gráficas muestran las tendencias y pueden ser histogramas, representaciones en “pastel”, “cajas con bigotes”, gráficos de líneas o de puntos de dispersión. En general, para resumir o presentar los datos obtenidos de un proyecto de investigación inicialmente se debe tratar de ubicar cómo se distribuyen, lo cual se

realiza de acuerdo con la escala de medición de cada variable. Algunos datos deben resumirse en un estimador de promedio y otros en uno de dispersión.

El estimador de promedio indica la tendencia central o cifra que representa mejor el valor de la muestra, la cual puede ser: Promedio o media (aritmética), obtenido con la suma de todos los valores individuales entre el número total de valores; representa el punto de equilibrio de la distribución de los datos. Mediana, que representa la cifra o valor que divide la muestra en dos mitades, es decir, el valor donde 50% de la población está por debajo o arriba del mismo. Moda o valor más frecuentemente encontrado en las mediciones. Las medidas de dispersión para las variables cuantitativas son tres: la desviación estándar o desviación típica, los rangos intercuartílicos y los valores mínimo y máximo. Todas permiten entender cómo se alejan los datos del promedio y la distribución dentro de los límites medidos. (Rendón et al, 2016).

4.7 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Cercenado et al, 2010) En la Tabla 2 se muestran las pruebas bioquímicas utilizadas en este trabajo de grado y su interpretación.

Tabla 2. Interpretación de pruebas bioquímicas

Prueba	Propósito	Resultado	
		Positivo	Negativo
TSI	Determina la capacidad que tiene un microorganismo para	Cambio de color en el medio de rojo a amarillo indica la fermentación de la glucosa lactosa	Ningún cambio de color en el medio indica ausencia de la

	fermentar la glucosa, lactosa y sacarosa.	y sacarosa (pico de flauta ácido/ profundidad ácida: A/A. - Cambio de color en el tercio del medio (parte inferior), indica fermentación de la glucosa, pero no de la lactosa ni sacarosa (pico de flauta alcalino/ profundidad ácida: (K/A). - Cambio de color en dos tercios del agar (parte inferior y medio), indica la fermentación de la glucosa y lactosa pero no de la sacarosa.	fermentación de los tres azúcares (K/K)
LIA	Descarboxilación de la lisina	Cambio a un color púrpura más fuerte indica presencia de la enzima: K/K.	Cambio a un color amarillo, ausencia de la enzima y fermentación del carbohidrato: K/A.
UREA	Determina la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima Ureasa	Si el medio vira a un color Rosado intenso o púrpura	Si no hay cambio de color
CITRATO	Determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono para su metabolismo y crecimiento	Color azul	Color verde

CATALASA		Determinar si la bacteria posee la enzima catalasa	La aparición rápida y sostenida de una cadena de burbujas de gas o efervescencia	La aparición leve y diminutas burbujas de gas al cabo de 20 a 30 segundos luego de adicionado el reactivo
OXIDASA		Determinar la presencia de la enzima oxidasa	Color azul profundo en un tiempo menor de 10 segundos. Se considera positivo lento a confirmar cuando el color se desarrolla entre 10 y 60 segundos	No hay desarrollo del color o un tono amarillo
S I M	SULFURO	Determinar producción de H ₂ S.	Producción de color negro	El medio queda igual
	INDOL	Determinar si la bacteria puede degradar triptófano a indol a través de Triptofanasa.	Rojo: presencia de indol (el triptófano fue degradado)	Amarillo (la bacteria no puede degradar el triptófano)
	MOTILIDAD	Determinar si la bacteria es Móvil	Difuminación del crecimiento de la bacteria hacia los lados	La bacteria sólo crece en la línea de inoculación

4.8 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU

FISH es una técnica molecular que ha sido ampliamente usada en la cuantificación y descripción de células microbianas presentes en los lodos activados, las aguas residuales y ecosistemas naturales. En esta técnica, los microorganismos son tratados con un fijador e hibridados con sondas específicas marcadas con colorantes fluorescentes en una lámina portaobjetos. Posteriormente las láminas son observadas en un microscopio de fluorescencia. Para el presente estudio se utilizaron mezclas de diferentes sondas; una de ellas, compuesta por una mezcla de las sondas Nit3 y NitB, que permiten reconocer grupos microbianos asociados al ciclo del nitrógeno como, las bacterias nitrificantes.

5. METODOS

5.1 INOCULOS SELECCIONADOS

Se seleccionaron 2 tipos de inóculos líquidos, estos se encontraban previamente enriquecidos en reactores tipo SBR en el laboratorio de microbiología ambiental, los inóculos utilizados fueron 1) 100 mL de inóculo proveniente de un sistema de tratamiento de Agua Residual Industrial - ARI (RL), que trata los efluentes líquidos de una industria productora de extractos de levadura y bio-ingredientes para la nutrición, ubicada en la ciudad de Tuluá y 2) 50 mL de inóculo de suelo de uso agrícola en la zona de Candelaria (RS). Los inóculos fueron llevados al laboratorio a temperatura ambiente ($27^{\circ}\text{C} \pm 2$) para el montaje de los reactores biológicos.

5.2 FASE 1: Reactivación del crecimiento de inóculos.

Se montaron reactores tipo SBR en botellas de vidrio de 1 L. Las botellas tenían un volumen de trabajo de 750 mL con una proporción v/v de sustrato: inóculo de 2:1 Las condiciones de operación y etapas del ciclo de los reactores se muestran en la Tabla 3. El proceso de la fase de reactivación del crecimiento de los inóculos se muestra en la Figura 3.

Tabla 3. Condiciones de operación de los reactores en la Fase 1.

Parámetro	Valor	Unidad
Tiempo de reacción aerobia	4	Horas
Tiempo de sedimentación	45	min
Volumen Inóculo	250	mL
Volumen sustrato	500	mL
Volumen útil	750	mL
Régimen de flujo	Mezcla completa	--
Tipo de aireación	Difusores	--

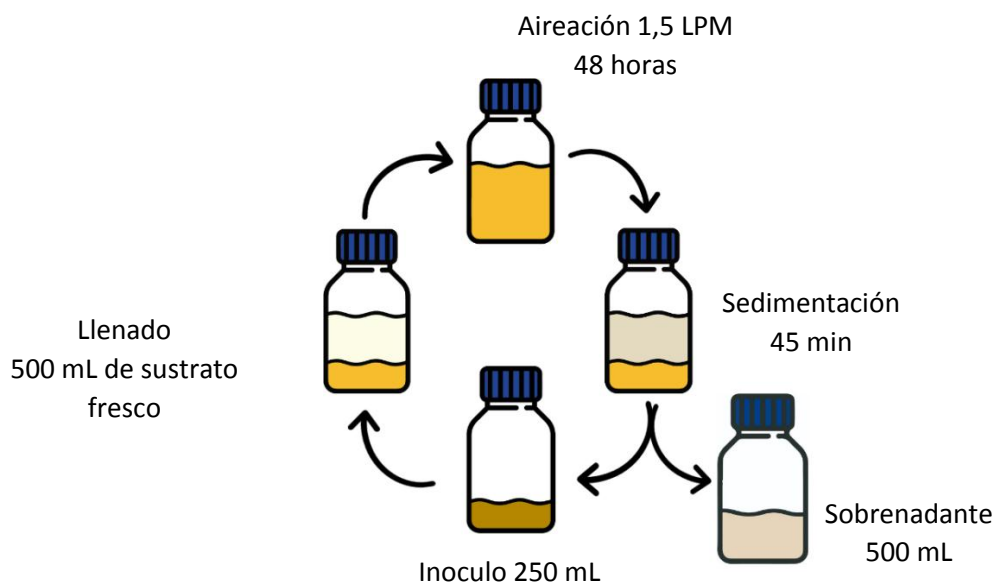


Figura 3. Etapas de un ciclo de operación de los reactores que fueron inoculados con suelo y lodo.

El medio de cultivo utilizado para alimentar los reactores fue un medio selectivo para microorganismos fijadores de nitrógeno, RBA (DSMZ, 2007). La composición de este medio se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio RBA para los reactores

Compuesto	Cantidad	Unidad
Solución A		
KH ₂ PO ₄	0,1	g
K ₂ HPO ₄	0,9	g
NaCL	0,1	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1	g
Mg ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,1	g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,005	g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,005	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	g
Elementos traza SL- 6	3	mL
Solución B	50	mL
Agua destilada	950	mL

Solución B		
Sacarosa	1	g
D- glucosa	2	g
Piruvato de sodio	1	g
D-Manitol	2	g
Agua destilada	50	mL

Los reactores, se colocaron de forma inclinada a 45 grados para favorecer la mezcla completa por medio de la aireación durante todo el tiempo de reacción. El montaje de esta fase se muestra en la Figura 4. Cada tipo de inóculo tuvo su reactor replica.



Figura 4. Montaje de reactores con sus réplicas.

5.3 FASE 2: Adaptación a condiciones salinas

Una vez renovado el crecimiento de los inóculos, los reactores fueron expuestos a diferentes concentraciones de sales de amonio. La sal utilizada fue sulfato de amonio que corresponde a un fertilizante ampliamente utilizado en el Valle del Cauca, este fertilizante es acidificante y provoca aumentos de la CE (Alarcón, 2002). Las concentraciones de amonio y CE utilizadas durante esta fase experimental se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones de amonio y conductividad eléctrica del sulfato de amonio utilizadas en la segunda fase de experimentación.

Semana	Concentración mg/L N	Sulfato de Amonio
		Conductividad (Ds/m)
1	50	1,59
2	100	2,33
3	250	5,24
4	450	12,78

Se montaron reactores tipo SBR, que consistieron en botellas vidrio de 500 mL, con un volumen útil de 300 mL, la proporción en volumen de sustrato: inóculo fue de 2:1. Los reactores estuvieron a temperatura ambiente, mezcla completa y aireación. Las condiciones de operación de los reactores durante esta fase se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de operación para los reactores en la fase 2.

Parámetro	Valor	Unidad
Tiempo de reacción aerobia	48	Horas
Tiempo de sedimentación	45	min
Volumen Inóculo	100	mL
Volumen sustrato	200	mL
Volumen útil	300	mL
Régimen de flujo	Mezcla completa	--
Tipo de aireación	Difusores	--

El medio de cultivo utilizado fue el mismo que en la fase de enriquecimiento (Tabla 4, Medio RBA). Al inicio de cada semana de operación se aumentó la concentración de sulfato de amonio a los reactores, conforme lo mostrado en la Tabla 6. En esta fase experimental cada reactor tuvo su réplica y blanco (control) que consistía en un reactor sin la adición de la sal.

5.4 SEGUIMIENTO DEL PROCESO

Una vez por semana se realizó la cuantificación de Amonio (NH_4^+) y nitratos (NO_3^-). Estas variables físico químicas siguieron el protocolo establecido en el Standard Methods (2012). Se realizó también la medición de pH, Oxígeno Disuelto (OD) y Conductividad Eléctrica. La densidad poblacional (Biomasa) se realizó mediante el método de peso seco y técnicas dependientes de cultivo.

Se realizó recuento en placa al final de cada semana, con el objetivo de seguir el cambio en las poblaciones microbianas. Los medios utilizados fueron, agar nutritivo, Eosin Methylene Blue Agar (EMB) y Medio selectivo para diazótrofos, (RBA).

Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de los géneros asociados a la fijación de nitrógeno. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron TSI, LIA, SIM, citrato, catalasa y oxidasa. Adicionalmente se realizó la detección de microorganismos por medio de la técnica molecular de Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH), que permitió observar la morfología y agrupación de otros grupos de bacterias.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a que los resultados corresponden a una observación, se utilizó estadística descriptiva para el análisis del presente trabajo. Diagramas de barra para la Fase experimental 1 y 2, así como para el recuento en placa realizado en ambas fases del experimento.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 FASE 1. REACTIVACION DEL CRECIMIENTO DE INOCULOS

Se montaron reactores tipo SBR para seleccionar y reactivar el crecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en los inóculos. Se realizaron las mediciones de la concentración biomasa al inicio y final del ciclo de operación de los reactores, con el objetivo de observar si existían cambios entre las concentraciones. En la Figura 5 se muestran los diagramas de barra con la concentración de biomasa en RL y RS al inicio y final de los ciclos de operación.

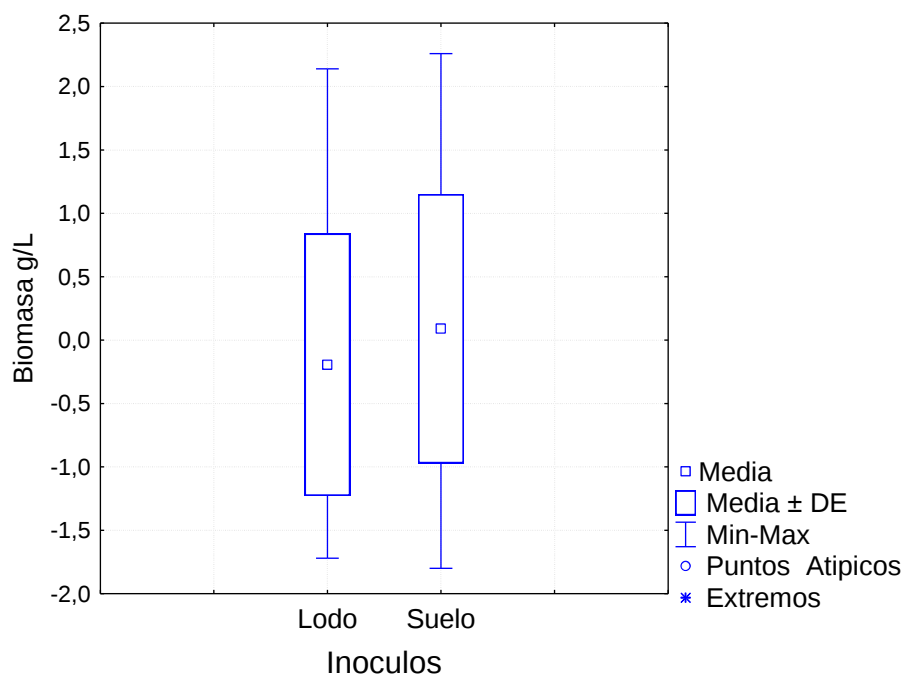
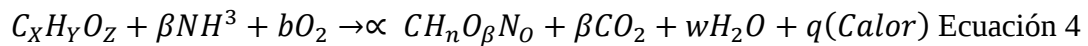
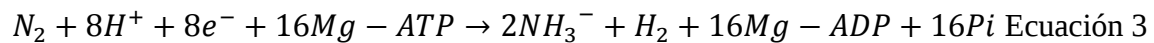


Figura 5. Promedio del cambio entre las concentraciones de biomasa en los reactores (RL y RS) al inicio y final de los ciclos de la fase de renovación del crecimiento de inóculos

*DE: Desviación Estándar, Min: Mínimo, Max: Máximo

La Figura 5 muestra que ambos inóculos (Suelo y lodo) presentan la misma tendencia al inicio y final del ciclo del reactor SBR (4,0 – 5,0 g/L). Según Cerón et al 2012, la fijación de nitrógeno

está relacionada con el aumento de la biomasa, lo que a su vez favorece la presencia de otros grupos metabólicos involucrados en el ciclo del nitrógeno, debido a la disponibilidad de otras formas de nitrógeno. La fijación de nitrógeno y la concentración de biomasa están relacionados de acuerdo a la estequiometria de los procesos metabólicos presentados a continuación.



La FBN es un proceso metabólico que demanda altas cantidades de energía, para la fijación de una molécula de N_2 se necesitan 16 moléculas de ATP y con ella se obtienen 2 moléculas de amonio utilizadas por la célula, por ello el crecimiento celular no es tan rápido si se compara con otras fuentes de nitrógeno. Eso refleja que, si la única fuente de nitrógeno para los microorganismos es el atmosférico, requerirá mayor energía para obtener el nitrógeno necesario y su crecimiento será más lento.

Por otro lado, durante esta fase, las condiciones ambientales de OD y pH estuvieron dentro de los rangos que permiten la nitrificación, es decir rangos de pH entre 6,5 -7,5 y OD mayor a 2mg/L (Pacheco et al. 2002). Esto debido a que las BFN proporcionaron el nitrógeno necesario en el medio, siendo la única fuente de nitrógeno disponible.

La Figura 6 y la Figura 7. Muestran las diferencias en las concentraciones de nitratos y amonio en los reactores de lodo (RL) y suelo (RS) al inicio y final del ciclo.

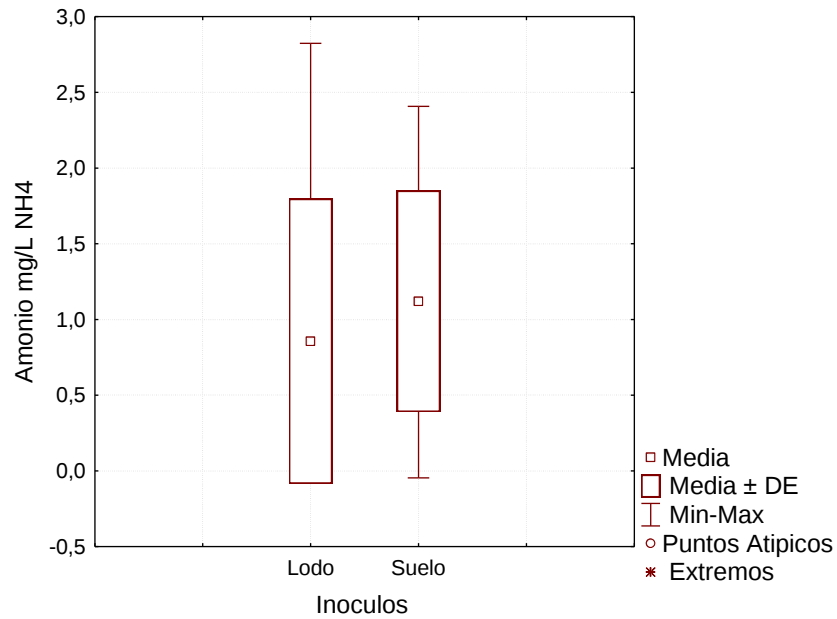


Figura 6. Promedio del cambio entre las concentraciones de Amonio de los dos reactores (RL y RS) al inicio y final de los ciclos de la fase de renovación de los inóculos

*DE: Desviación Estándar, Min: Mínimo, Mx: Máximo

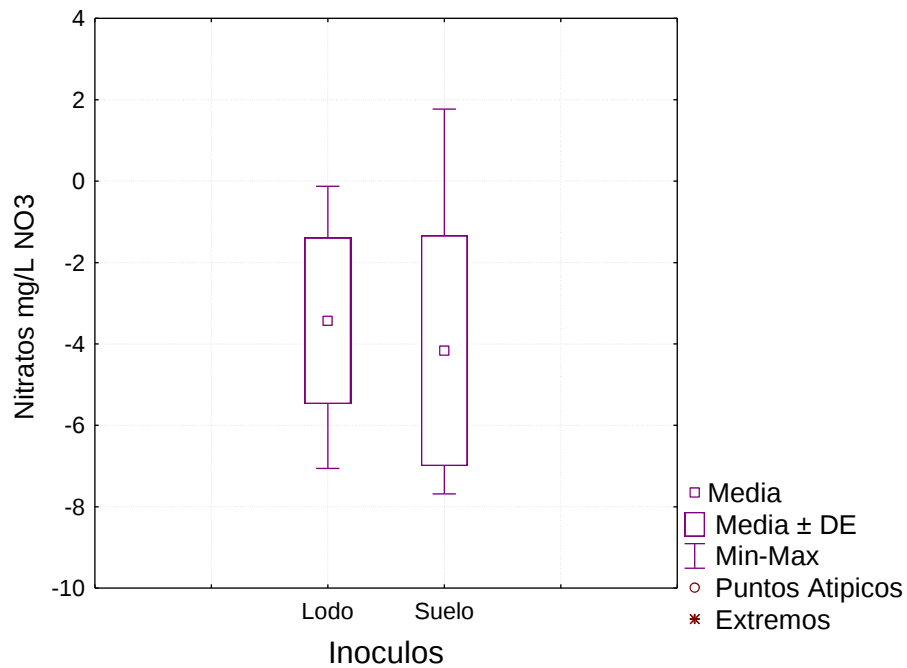
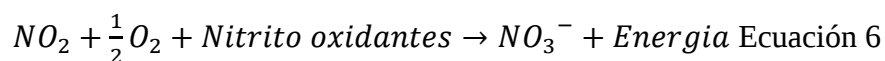
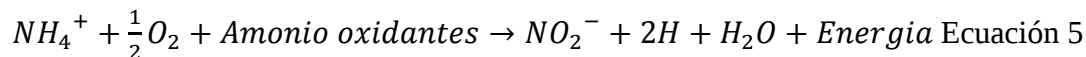


Figura 7. Promedio del cambio entre las concentraciones de nitratos de los dos reactores (RL y RS) al inicio y final de los ciclos de la fase de renovación de los inóculos

*DE: Desviación Estándar, Min: Mínimo, Mx: Máximo

De la Figura 6 y 7 se puede evidenciar la variación de la concentración tanto para el inoculo de suelo como para el inoculo de lodo a lo largo de los ciclos del reactor SBR, esto sugiere la presencia de otros grupos de microorganismos, como por ejemplo los microorganismos nitrificantes encargados de transformar el amonio a nitrato en condiciones aeróbicas. Las reacciones de la nitrificación (Aveñado, 2011) se muestran a continuación.



La nitrificación es un proceso clave en el ciclo del nitrógeno en muchos ecosistemas. Por ejemplo, en los ecosistemas terrestres este proceso es de crucial importancia debido a que a la larga regula directa o indirectamente el balance del nitrógeno inorgánico en los suelos. Así como se muestra en las Figuras 6 y 7 donde las concentraciones de nitratos disminuyen a medida que el ciclo en el reactor avanza y al final del ciclo las concentraciones de amonio son más elevadas, evidenciando crecimiento celular y con ello la fijación de nitrógeno al inicio del ciclo de los reactores.

Por otro lado, en la Figura 8 se muestra la densidad poblacional en unidades formadoras de colonia según el medio de cultivo en el que fueron sembradas las bacterias, pertenecientes a RL Y RS al inicio y final de la fase experimental 1.

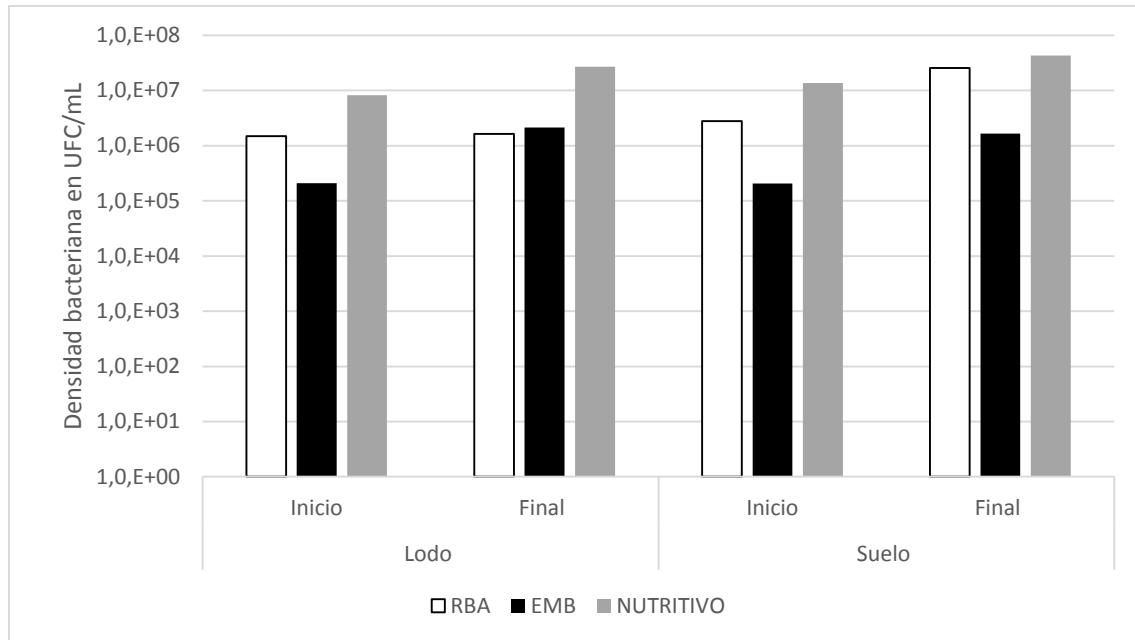


Figura 8. Densidad poblacional de los reactores RL y RS presente en tres medios de cultivos al inicio y al final de la fase de reactivación de inóculos

*UFC: Unidades Formadoras de Colonias, RBA: Medio selectivo para diazótrofos, EMB: Methylene Blue Agar

Debido a que esta fase experimental, corresponde a una fase de reactivación del crecimiento de los inóculos, no se puede apreciar el aumento significativo de una u otra especie entre el inicio y final de la fase. Sin embargo se observa el incremento en la concentración de bacterias del medio de cultivo RBA en el inóculo del suelo correspondiente a BFN. Es importante anotar que al no tener una fuente de Nitrógeno en el medio, durante cuatro semanas de operación el crecimiento al final de esta fase se explica a partir de la fijación de Nitrógeno.

La Fase experimental 1 mantuvo a los reactores RL y RS en condiciones que le suministraron al sistema el nitrógeno necesario para su crecimiento celular, permitieron activar su capacidad fijadora de nitrógeno y además garantizar la presencia de microorganismos nitrificantes y otros asociados al ciclo del nitrógeno, como se describe en el ciclo global del nitrógeno de la Figura 9. Una vez suministrado el nitrógeno, era asimilado por las BFN, obteniendo concentraciones de amonio de hasta 3 mg.L⁻¹. La fijación de nitrógeno era nuevamente activada una vez las concentraciones de amonio en el medio fueran consumidas.

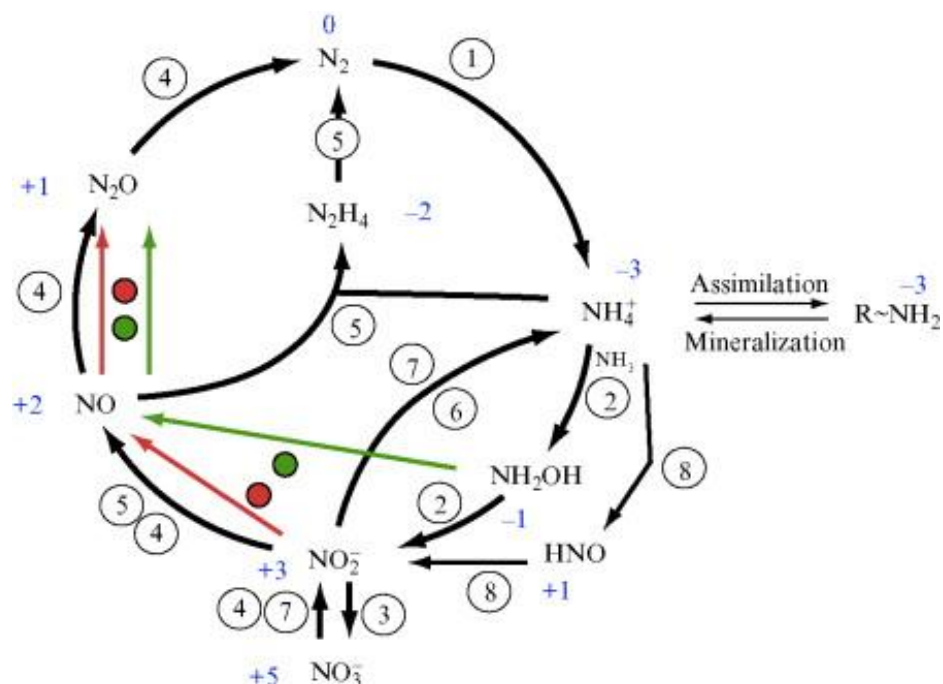


Figura 9. Ciclo del nitrógeno

(1) Fijación de nitrógeno. (2) Oxidación aeróbica de amoníaco a nitrito por bacterias. (3) Oxidación aeróbica de nitrito a nitrato por bacterias. (4) Desnitrificación clásica. (5) Desnitrificación de la oxidación anaeróbica de amoníaco (Anammox). (6) Amonificación respiratoria. (7) Amonificación asimilatoria. (8) Oxidación aeróbica de amoníaco a nitrito por arqueas. Los puntos indican oxidación aerobia de hidroxilamina y nitrito desasimilatorio y vías de reducción de la desnitrificación aeróbica de nitrificadores. **Fuente.** Klotz y Stein (2010).

6.2 FASE EXPERIMENTAL 2: CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

Las condiciones de estrés salino a las que fueron expuestos RL y RS superan las características de suelos degradados por salinidad que se han reportado como inhibidores de BFN. (CVC, 2015).

Los reactores RL y RS fueron operados con las mismas condiciones ambientales que en la Fase experimental 1, pero cada semana se aumentó la concentración de sal en el medio (150 mg.L^{-1}). La forma de amonio utilizada fue sulfato de amonio (NH_4^+) debido a los aumentos de su Conductividad Eléctrica (CE). La Figura 10 presenta los cambios de la concentración de amonio al inicio y final de los ciclos de operación de la fase experimental 2 en los reactores RL y RS.

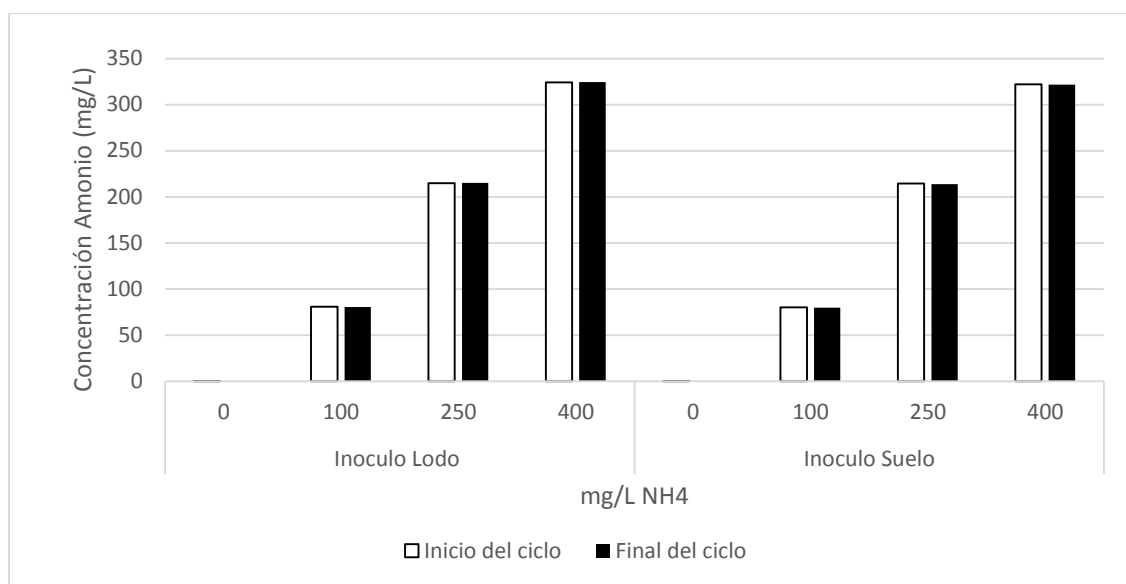


Figura 10. Cambio entre las concentraciones de amonio al inicio y final de los ciclos de operación de los reactores RL y RS de la Fase de condiciones de estrés salino
Eje horizontal: Concentraciones de amonio añadidas al medio cada semana

El aumento de la cantidad de amonio adicionado en cada tratamiento, tuvo un efecto significativo desde la primera concentración. Esta situación, muestra que una vez adicionada la primera concentración de sal, no existe diferencia entre la concentración de amonio al inicio y al final del ciclo en los reactores. Por lo tanto, el amonio adicionado no fue utilizado como fuente de nitrógeno, quedando en exceso en el medio. Esto es resultado del desbalance de la relación C: N que tienen los microorganismos en el medio. Al aumentar la cantidad de nitrógeno, sin aumentar la cantidad de fuentes de carbono la relación C: N disminuye, lo que limita el crecimiento celular y el consumo de nitrógeno, mientras se presenta una acumulación de nitrógeno en el medio.

La situación es diferente si se observan las diferencias entre las concentraciones de nitratos al inicio y final de los ciclos del reactor SBR como se muestra en la Figura 11. La diferencia entre las concentraciones de nitratos evidencia que las bacterias nitrificantes presentes en los reactores continuaron el proceso de nitrificación, aun con las condiciones de estrés salino presente en los reactores. Para este proceso, los microorganismos podían usar tanto el nitrógeno suministrado, como el de la FBN.

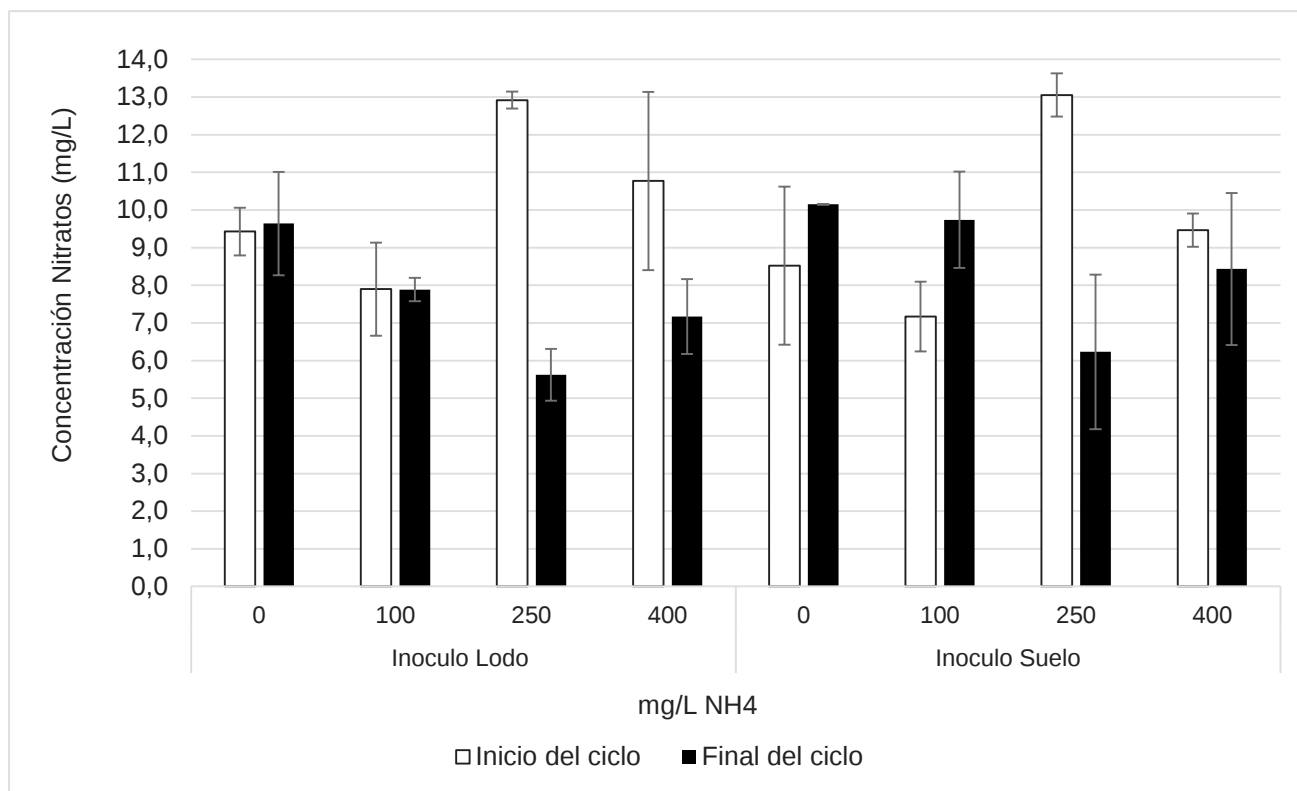


Figura 11. Concentraciones de nitratos al inicio y final de los ciclos de operación en RL y RS de la Fase de condiciones de estrés salino

Eje horizontal: Concentraciones de amonio añadidas al medio cada semana

La Figura 12. Muestra las concentraciones de biomasa al inicio y final de los ciclos de operación de los reactores RL y RS.

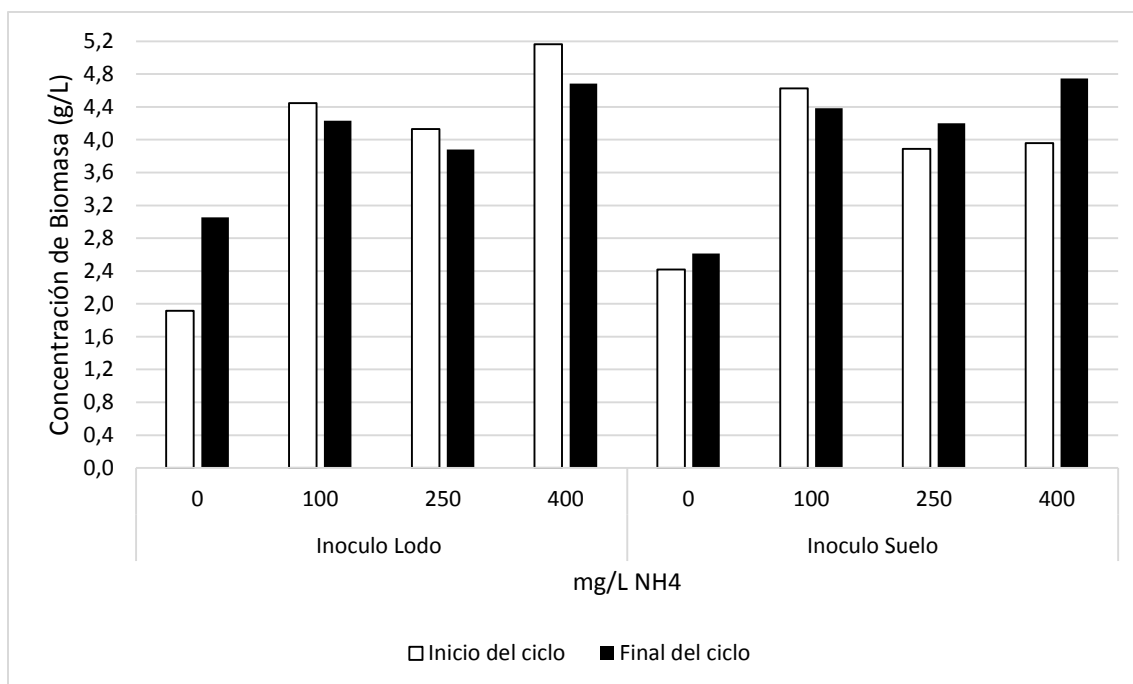


Figura 12. Concentración de biomasa al inicio y final de los ciclos de operación de los reactores RL y RS de la fase de condiciones de estrés salino

Eje horizontal: Concentraciones de amonio añadidas al medio cada semana

La Figura 12 muestra que, una vez adicionada la primera concentración de amonio, la biomasa no presento diferencias significativas en su concentración, a pesar de que las concentraciones disminuyeron durante los primeros ciclos con niveles de estrés salino, principalmente en RL. Lo que indica que la biomasa al igual que en el caso del nitrato no utilizo la fuente de nitrógeno suministrada para su crecimiento celular, pero este pudo inhibir su crecimiento dentro del reactor en los primeros ciclos de operación de la fase experimental 2. Los resultados mostrados anteriormente señalan que los inóculos provenientes de un sistema de tratamiento de aguas residuales industriales y de suelo con vocación agrícola en la zona de Candelaria son capaces fijar nitrógeno en condiciones normales y asimilar el nitrógeno en condiciones de estrés salino. La cantidad de microorganismos presentes según las diferentes concentraciones de amonio, se presentan en la Figura 13.

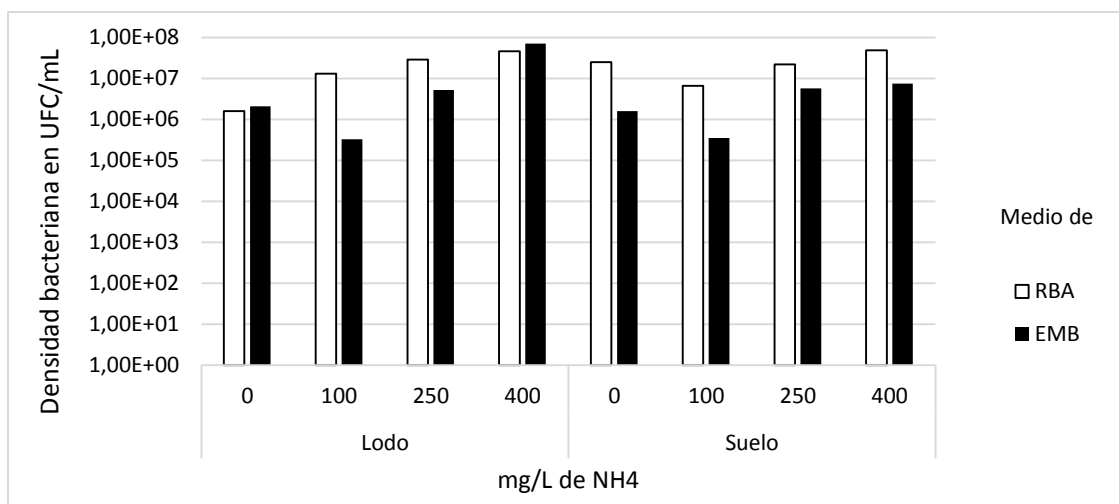


Figura 13. Densidad bacteriana de los reactores RL y RS presente en dos medios de cultivo al final de los ciclos de la Fase de condiciones de estrés salino

*RBA: Medio selectivo para diazotrofos, EMB: Methylene Blue Agar

Eje horizontal: Concentraciones de amonio añadidas al medio cada semana

Los resultados muestran que la cantidad de BFN estimadas fue alta, tomando como línea base los resultados obtenidos en la fase experimental I. Durante esta fase las BFN lograron adaptarse a las diferentes concentraciones de salinidad adicionadas a los reactores e incluso incrementar sus concentraciones. En la Figura 13 se evidencia que el RL presentó incremento mayor en la concentración de bacterias que RS, lo que sugiere que las bacterias presentes en el sistema de tratamiento de aguas residuales podrían ser halotolerantes, pues según estudios realizados por Ramadoss et al (2013) sobre microorganismos halófilos y halotolerantes, señala que son un grupo capaz de crecer bien en los medios que contienen un rango de NaCl entre 1% – 33% (p/v) es decir una CE mayor a 17 Ds.m^{-1} .

Los resultados anteriores demuestran que los inóculos obtenidos de los Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales enriquecidos en reactores SBR son capaces de asimilar y adaptarse al amonio en condiciones de estrés salino, además de fijar nitrógeno si el amonio no se encuentra presente en el medio.

6.3 PRUEBAS DE DETECCIÓN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA

De los dos inóculos se obtuvieron 5 aislamientos (3 del lodo y 2 del suelo) a los cuales se le hicieron pruebas bioquímicas de acuerdo con el Bergey's manual of determinate bacteriology editado por Holt et al., (1994). Los aislamientos de lodos correspondían a bacterias Gram negativas y los suelos a bacterias Gram positivas. En la Tabla 7 Se muestran los resultados obtenidos de las pruebas para el suelo y el lodo.

Tabla 7. Pruebas bioquímicas aplicadas a colonias aisladas de lodo y de suelo

Prueba	Resultado				
	Lodo			Suelo	
	Colonia 1	Colonia	Colonia 3	Colonia 1	Colonia 2
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
LIA	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
UREA	-	-	-	-	-
CITRATO	+	+	+	+	+
Catalasa	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	-	-	-
Sulfuro	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+

Como se puede observar en la Tabla 7. Se utilizaron dos pruebas para identificación preliminar con lectura inmediata (Catalasa y oxidasa) La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.

La prueba bioquímica oxidasa permite determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa se encuentra en las bacterias aerobias y algunas anaerobias facultativas. La oxidasa positiva sugiere la presencia de bacterias nitrificantes, pues es la enzima encargada de realizar transformaciones en la nitrificación dentro del ciclo del nitrógeno (Kuypers, Marchant, & Kartal, 2018). Además, los géneros de interés como *Azospirillum* y *Burkholderia* o *Pseudomonas*, son oxidasa positivos, lo que permitió seleccionar esta técnica para identificar y seleccionar los aislamientos reduciendo el número de bacterias a evaluar. De la misma forma géneros como *Azotobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* de igual interés son oxidasa negativa. (Velandia, 2016).

Mediante la técnica FISH, se realizó la detección de grupos microbiológicos diferentes a las BFN, como lo son las bacterianas nitrificantes. Se tomaron muestras al inicio, mitad y final de todo el estudio. Esta técnica utiliza fragmentos de secuencias de ADN, sonda marcada con fluorescencia, con el fin de localizar una secuencia complementaria en el ADN (Lavaut et al, 2016). Existen varios tipos de sondas, pero para el caso de gen nif (involucrado en la FBN) no hay descrita una sonda. Por lo tanto, en este experimento se utilizaron diferentes sondas de bacterias nitrificantes, con el fin de determinar si las diferentes concentraciones de amonio agregadas durante la fase experimental II afectaron los procesos del ciclo del nitrógeno llevados a cabo en los reactores, esto debido a que todas las bacterias nitrificantes son de crecimiento lento y sensibles a cambios en las condiciones de crecimientos (Aveñado et al, 2011). En la Figura 14 y 15 se presentan las micrografías de la técnica FISH, para RL y RS respectivamente, lo que permitió corroborar la existencia de bacterias presentes en los reactores diferentes a las fijadoras de nitrógeno.

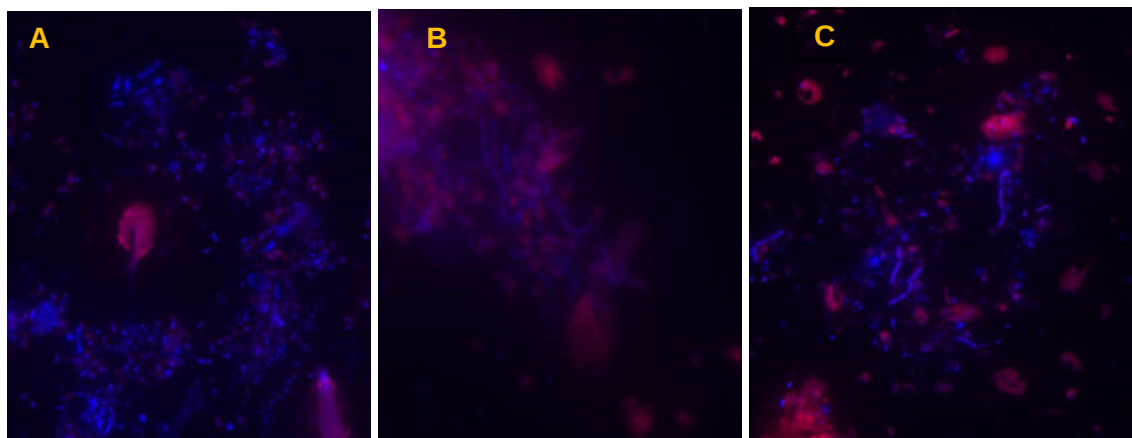


Figura 14. Micrografía de FISH tomada con microscopio Nikon 90i de (A) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 (Rojo) al inicio de la fase experimental I del reactor de lodo, (B) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 (Rojo) con concentraciones de 250mg/L N en el reactor y (C) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 (Rojo) al final de la fase experimental II, ADN restante con DAPI (azul).

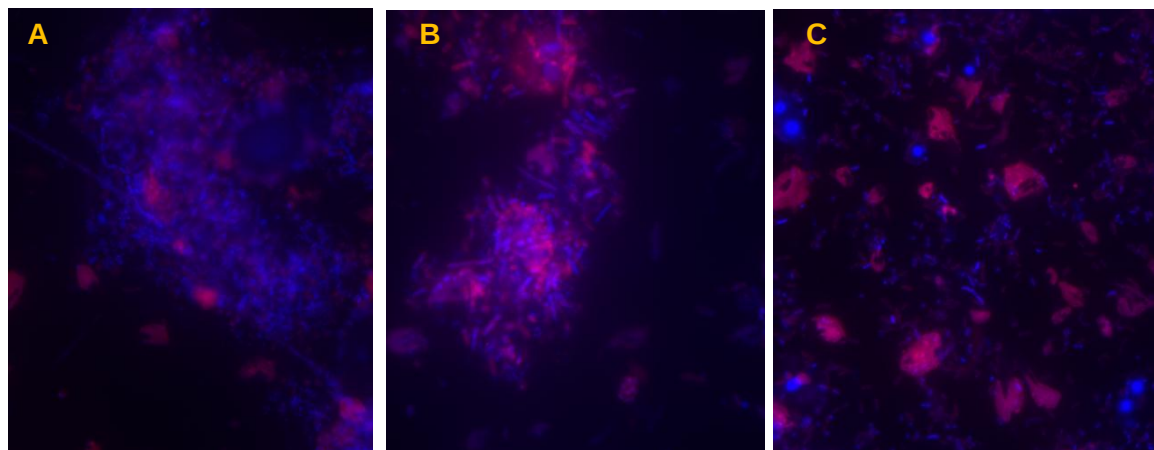


Figura 15. Micrografía de FISH tomada con microscopio Nikon 90i para reactor de suelo (A) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 (Rojo) al inicio de la fase experimental I (B) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 (Rojo) con concentraciones de 250mg/L N en el reactor (C) Microorganismos nitrificantes hibridados con mezcla de sondas NITB y NIT3 (Rojo) al final de la fase experimental II, ADN restante con DAPI (azul).

En la Figura 14 y 15 Se observa el aumento de las zonas hibridadas con la mezcla de sondas NITB y NIT3. El género *Nitrococcus mobilis* pertenece al grupo de las bacterias nitrificantes subclase b de las proteobacterias (NITB). Estas bacterias parecen estar presentes en reactores con altas concentraciones de amonio y con concentraciones de sales elevadas (Aveñado et al, 2010). Por lo que es de esperarse que este género prevaleciera al final de la fase experimental II en comparación con otros géneros de bacterias oxidadoras de nitritos.

7. CONCLUSIONES

Las bacterias provenientes del sistema de tratamiento de aguas residuales industriales (ARI) y del suelo de vocación agrícola fueron capaces de utilizar la fijación biológica de nitrógeno como mecanismo para incorporar el nitrógeno necesario y transformarlo a amonio durante la fase de enriquecimiento y consumir el suministrado en la segunda fase experimental para su crecimiento celular.

Las BFN pertenecientes al inóculo del sistema de tratamiento de aguas residuales industriales y al inóculo de suelo de vocación agrícola mostraron resistencia y adaptabilidad a las concentraciones de sales adicionadas durante la segunda fase experimental. Los resultados de este experimento sugieren aplicabilidad biotecnológica y son importantes al momento de definir las condiciones de producción de biofertilizantes.

Los inóculos evaluados podrían ser un potencial biofertilizante, como alternativa de recuperación de suelos degradados por salinidad. Debido a su exitosa adaptabilidad a las condiciones de estrés salino a las que estuvo expuesto durante la segunda fase experimental, en la que se evidenció que las poblaciones de BFN se conservaron en el tiempo.

La adaptabilidad a las condiciones de estrés salino de grupos de bacterias diferentes a las fijadoras de nitrógeno permitió que se llevarán a cabo los diferentes procesos relacionados con el ciclo del nitrógeno dentro de los reactores durante las fases experimentales, como se pudo observar con métodos como FISH.

8. RECOMENDACIONES

Es necesaria la implementación de técnicas directas y estandarizadas para la estimación de la cantidad de nitrógeno fijado en futuras investigaciones.

En posteriores investigaciones, es importante llevar a los reactores a concentraciones de estrés salino más altas (extremas) para conocer la concentración límite en la que el sistema llegaría a desestabilizarse y lograr determinar si las bacterias presentes en los reactores son consideradas halófitas.

Llevar los inóculos seleccionados y adaptados a concentraciones de estrés salino a diferentes ambientes, para ser probados y verificar la posibilidad que tienen de ser usados como un biofertilizante para la recuperación de suelos degradados por salinidad.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, V. (2002) Consideraciones necesarias en la preparación de la solución nutritiva. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Arroyo, A. (2017). Producción de amonio y biomasa activa a partir de consorcios microbianos provenientes de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas. Universidad del Valle.
- Asprilla, P. (2016) Análisis de composición y distribución de bacterias fijadoras de nitrógeno en ecosistemas del Valle del Cauca.
- Aveñado, D. (2011) Estudio de la población de bacterias nitrificantes y su relación con los parámetros físico-químicos, biológicos y operacionales de una EDAR con sistema convencional de lodos activados. Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado a partir de https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/15902/Tesina_Liz_Avenda%C3%B1o.pdf?sequence=1
- Atlas, R. y Bartha, R. (2002). Ecología microbiana y microorganismos. Pearson Educación S.A. Madrid.
- Betancor L., Gadea M., Flores K. Genética bacteriana (temas de bacteriología y virología medica). 59-65. Recuperado a partir de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/GeneticaBacteriana.pdf>
- Calvo, S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca.

- Carrera, J. (2001). Eliminación biológica de nitrógeno en un efluente con alta carga. Estudio de los parámetros del proceso y diseño de una depuradora industrial. Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cerón, L. & Aristizábal, F., 2012. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. Revista Colombiana de Biotecnología, 14(1), pp.285–295.
- Claros, J. (2012) Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal. Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado a partir de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/17653/tesisUPV3951.pdf?sequence=1>
- Cherkasov, N., Ibadon, a. O., & Fitzpatrick, P. (2015). A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 90, 24–33. <http://doi.org/10.1016/j.cep.2015.02.004>
- Correa, L. 2001. Evaluación preliminar de la actividad microbial en suelos con alta saturación de magnesio y residualidad de plaguicidas en el valle del río Cauca. Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira.
- Cuervo J. (2010) Aislamiento y Caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de Nitrógeno y Solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología agrícola y veterinaria. Recuperado a partir de: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>
- Corrales, L. Caycedo, L. Gómez, M. Ramos, S. Rodríguez, J. (2017) Bacillus spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. NOVA 15: 45-65
- CVC, 2015 Guía rápida temática para el usuario SIG. Salinidad del suelo

- Danso, S. K., & Eskew, D. (2005). Aumento de la capacidad de fijación biológica del nitrógeno, 26(2).
- Decheco, A. (2011). Metabolismos microbianos. Callao, Universidad Nacional del Callao.
- Duarte, P. (2016). Bioprospección de microorganismos diazótrofos como una alternativa para el mejoramiento del suelo en el canopy urbano de la Universidad EAN. Revista Ontare, 4(1), 67-87. <https://doi.org/10.21158/23823399.v4.n1.2016.1516>
- Engel, T., & Reid, P. J. (2007). Introducción a la fisicoquímica: termodinámica. Pearson Educación.
- Estrada, G. (2008). Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: Efecto sobre la población, humedad y pH del producto. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado a partir de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis228.pdf>
- Estupiñan, R. & Quesada, B., (2010). El proceso Haber-Bosch en la sociedad agroindustrial: peligros y alternativas. Recuperado a partir de [at: http://www.ilsa.org.co:81/biblioteca/dwnlds/od/elotrdr042/3.pdf](http://www.ilsa.org.co:81/biblioteca/dwnlds/od/elotrdr042/3.pdf)
- Fisher, K., & Newton, W. (2002). Nitrogen fixation- A general overviews in nitrogen fixation at the millennium. Elsevier.
- Guerrero, R. (1995). Fertilización de cultivos en clima cálido. Monómeros Colombo Venezolanos S.A.
- Hernández, J. (2011) Bio recuperación de suelos salinos con el uso de materiales orgánicos. Universidad Politécnica de Madrid. Recuperado a partir de http://oa.upm.es/14869/1/JACQUELINE_HERNANDEZ_ARAUJO.pdf

- IDEAM, CAR y U.D.C.A, 2017. Protocolo para la identificación y evaluación de la degradación de suelos por salinización. IDEAM.
- IDEAM, U.D.C.A 2015. Síntesis del estudio nacional de la degradación de suelos por erosión en Colombia - 2015. IDEAM - MADS. Bogotá D.C., Colombia. Recuperado a partir de <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023648/Sintesis.pdf>
- IGAC. (1988). Suelos y bosques de Colombia. Bogotá: Instituto Geográfico Agustín Codazzi.
- Jetten, M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L., De Vries, S., Van Loosdrecht, M. y Kuenen, G. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van leeuwenhoek*. 71, 75-93.
- Jiménez, J. J., & Thomas, R. J. (2003). El arado natural: Las comunidades de macroinvertebrados en el suelo de las sabanas neotropicales de Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 443.
- Klotz, M. G., and Stein, L. Y. (2010). Genomics of ammonia-oxidizing bacteria and insights to their evolution. In "Nitrification," (B. B. Ward, D. J. Arp, and M. G. Klotz, eds.), pp. 57–93. ASM Press, Washington, DC
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 263.
- López, I. (2017) Preparación y caracterización de catalizadores basados en Ag-zeolitas para la reacción de oxidación catalítica de amonio. Universidad Politécnica de Valencia pp. 1.

- Mantilla-Paredes, A. J., Cardona, G. I., Peña-Venegas, C. P., Murcia, U., Rodríguez, M., & Zambrano, M. M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de biología tropical*, 57(4), 915-927
- Mulas, D., García-fraile, P., Carro, L., Ramírez-bahena, M., Casquero, P., Velázquez, E., & González-andrés, F. (2011). Soil Biology & Biochemistry Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(11), 2283–2293. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.018>
- Muñoz, J, Ramos. M (2014) Reactores discontinuos secuenciales: Una tecnología versátil en el tratamiento de aguas residuales. *Ciencia e ingeniería Neogranadina*. Recuperado a partir de <http://www.scielo.org.co/pdf/cein/v24n1/v24n1a03.pdf>
- Ochoa Carreño, D, & Montoya Restrepo, A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *revista facultad de ciencias económicas: investigación y reflexión*, 18(2), 55-74. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0121-68052010000200004&lng=en&tlng=es.
- Orozco J. C, Martínez P. (2009) Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos aislados de la rizosfera de *Pinus patula* en Colombia. Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt, Estación Forestal La Florida, Cota.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (2015). Nuevas opciones para suelos sanos. El uso de fertilizantes sobrepasara los 200 millones de

toneladas en 2018. Recuperado a partir de <http://www.fao.org/newa/story/item/277654/icode/>

- Pacheco, J., Pat, R. & Cabrera, A., 2002. Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Ingeniería*, 6(3), pp.73–81.
- Paredes. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Recuperado a partir de <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/greenstone/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas>
- Paredes, J.F., Ramos, M., (2014) Reactores discontinuos secuenciales: Una tecnología versátil en el tratamiento de aguas residuales. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 24 (1), pp 49-66. Recuperado a partir de <http://www.scielo.org.co/pdf/cein/v24n1/v24n1a03.pdf>
- Perdomo, C. y Barbazán, M. (2009). Nitrógeno. Cátedra de Fertilidad. Área de suelos y aguas. Facultad de agronomía. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.
- 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). <https://doi.org/10.25100/iyc.v13i2.2676>
- Pérez, N. (2006). Cuantificación de bacterias nitrificantes, desnitrificantes, fijadoras de nitrógeno y heterótrofas de humedales artificiales subsuperficiales el tratamiento de agua residual. Pregrado en Biología. Santiago de Cali, Universidad del Valle
- Pórtela D., Chaparro A, López S. (2013) La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *NOVA.* ; 11: 87-96.

- Philippot, L., & Germon, J. C. (2005). Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. En *microorganisms in soils: Roles in genesis and functions* (pp. 159-176). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_8

- RAMADOSS, D., LAKKINENI, V. K., BOSE, P., ALI, S. & ANNAPURNA, K. 2013. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Plus*, 2 (1): 6.

- Rendón M, Villasís M, Miranda M. Estadística descriptiva. *Rev Alerg Mex.* 2016;63(4):397-407

- Rodríguez, C. (2014). Enriquecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre provenientes de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.10619.11043>

- Rodríguez, E. A. (2009). Efecto de la fertilización química, orgánica y biofertilización sobre la nutrición y rendimiento de ají (*Capsicum spp.*) en el Valle del Cauca. Corpoica.

- Rodríguez, O. M. (2014). Biofertilización de nitrógeno en suelos salinos a partir de consorcios microbianos obtenidos de sistemas de tratamiento de aguas residuales [recurso electrónico] - Universidad del Valle. Recuperado a partir de <http://opac.univalle.edu.co/cgiolib/?infile=details.glu&luid=858741&rs=3441169&hitno=6>

- Sarria, J. D (2018) Biofertilización con consorcio diazótrofos proveniente de biomasa STARD como complemento de la fertilización nitrogenada en cultivo de albahaca (*Ocimum basilicum L.*)

- Santilla, J. (2003). Formación del ingeniero químico y textil. Materiales de enseñanza.

- Secretaria de agricultura y pesca. (2008). Plan de desarrollo sectorial agrícola, pecuario, forestal, acuícola y pesquero. Departamento del Valle del Cauca.
- Serrato. R, Ortiz. A, Dimas. L, Berúmen. P (2002) Aplicación de lavado estiércol para recuperar suelos salinos en la comarca Lagunera, México. Recuperado a partir de <https://www.chapingo.mx/terra/contenido/20/3/art329-336.pdf>
- Travers, D. (2007). Microbiología aplicada a las ciencias ambientales: reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales. Pregrado en Licenciatura Bioquímica. Montevideo, Universidad de la República
- Velandia, K. (2016) Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas de caña panelera en dos zonas productoras de Colombia. Universidad Nacional de Colombia
Recuperado a partir de <http://bdigital.unal.edu.co/57092/7/karenavanesavelandiaprieto.2016.pdf>
- Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. Science of the Total Environment, 48-65
- Wang, M., Shen, Q., Xu, G., & Guo, S. (2014). New Insight into the Strategy for Nitrogen Metabolism in Plant Cells. INTERNATIONAL REVIEW OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, VOL 310, 310, 1–37.
- Warakomski, A., Kempen, R. y Kos, P. (2007). *Microbiology/Biochemistry of the Nitrogen Cycle. Innovation process applications*. New Brunswick, 277-285
- Wargner, S. (2012). Biological nitrogen fixation - Biology & technology. Recuperado a partir de <https://sites.google.com/site/biologyhust/topic-1/biologicalnitrogenfixation>
- Zúñiga, O., Osorio, J., Guependo. R., Peña, J. (2011) Evaluación de tecnologías para la recuperación de los suelos degradados por salinidad. Revista Facultad Nacional de

Agronomía Medellín [S.I], v. 64, n. 1, p. 5769-5777 Disponible en:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/rt/captureCite/26378/37107>