

DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NITRIFICANTE DE AISLADOS BACTERIANOS ASOCIADOS A LA RIZÓSFERA DE TRES ESPECIES DE MACRÓFITAS

DETECTION AND EVALUATION OF NITRIFYING POTENTIAL OF BACTERIAL ISOLATES ASSOCIATED TO RHIZOSPHERE OF THREE MACROPHYTE SPECIES

BOTELLO, S. WILMAR^{1,2*} Ing.; PUERTO, M. DERLY¹; MONTES, V. DONICER^{2,3} M.Sc.; RODAS, M. ELKIN² M.Sc.

¹Fundación Universitaria de San Gil-Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Yopal, Colombia.

²Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Estadual Paulista, Jaboticabal (UNESP), SP, Brasil.

³Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia. Sincelejo, Colombia.

Palabras Clave:

Oxidación de amonio y nitrito,
Nitrificación,
Humedal natural,
Macrófitas.

Resumen

En el presente estudio se realizó el análisis de la fracción cultivable de bacterias nitrificantes asociadas a la rizósfera de tres especies de macrófitas en humedal natural de Aguazul, Casanare. El diseño experimental se basó en la cuantificación, aislamiento y establecimiento de cultivos axénicos de bacterias litoautotróficas y heterotróficas con fenotipo BAO (oxidación de amonio a nitrito) y fenotipo NOB (oxidación de nitrito a nitrato). Una vez seleccionados los aislados bacterianos, se realizaron diversas pruebas para determinar su potencial nitrificante y posteriormente fueron caracterizados a nivel bioquímico. Fue detectada una alta proporción de bacterias nitrificantes litoautotróficas con fenotipo BAO en las muestras analizadas, y fue obtenido un grupo de aislados con diverso potencial nitrificante correspondientes a los géneros *Nitrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, y *Staphylococcus sp.* Se concluye que el hábitat en estudio presenta una alta concentración de bacterias nitrificantes, y que los aislados recuperados evidencian un potencial promisorio para la evaluación y optimización de procesos de remoción biológica de nitrógeno.

Key words:

Ammonium and nitrite oxidation,
Nitrification,
Natural wetland macrophytes.

Abstract

In the present study the analysis of the cultivable fraction of nitrifying bacteria associated with the rhizosphere of three species of macrophytes on natural wetland in Aguazul, Casanare was performed. The experimental design was based on the quantification, isolation and establishment of axenic cultures of lithoautotrophic and heterotrophic bacteria with BAO phenotype (oxidation of ammonia to nitrite) and NOB phenotype (oxidation of nitrite to nitrate). Various tests were conducted to determine the nitrifying potential of the bacterial isolates. Subsequently, these isolates were characterized through of biochemical probes. It was detected high proportion of lithoautotrophic nitrifying bacteria with BAO phenotype, and a group of isolates with nitrifying potential was obtained, corresponding to the genera *Nitrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, and *Staphylococcus sp.* We conclude that habitat study presents a high concentration of nitrifying bacteria, and that the recovered isolates have a promising potential for the evaluation and optimization of processes of biological nitrogen removal.

INFORMACIÓN

Recibido: 21-06-2014;

Aceptado: 20-10-2014.

Correspondencia autor:

wbotello@unisangil.edu.co

Introducción

La oxidación biológica de amonio y nitrito es una de las etapas centrales del ciclo del nitrógeno. Este proceso, denominado nitrificación, típicamente es realizado por tres grupos bacterianos: i. oxidantes de amonio litoautotróficos, ii. oxidantes de nitrito litoautotróficos y iii. nitrificantes heterotróficos (ADDISCOTT *et al.*, 2005). La nitrificación inicia con la oxidación de amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-), seguida de la oxidación de NO_2^- a nitrato (NO_3^-). En humedales naturales este proceso está fuertemente influenciado por la presencia de plantas acuáticas. Consecuentemente, en la rizósfera de dichas plantas se presenta una alta densidad de bacterias nitrificantes, debido en parte a la concentración de exudados vegetales ricos en carbono, y a las concentraciones de O_2 libre necesario durante el proceso de nitrificación (PAPEN *et al.*, 1998; LOBELIA *et al.*, 1997). No obstante, el ion NH_4^+ , es requerido así mismo por la planta, y por tanto se presenta competencia por dicho compuesto en este sistema. Este fenómeno conlleva a la generación de estrategias microbianas que tienden a favorecer la diversificación metabólica de especies, y por tanto, al aumento de su potencial para la captación de amonio y de compuestos orgánicos nitrogenados (para el caso de nitrificantes heterotrófos). En efecto, esta amplia diversidad de microorganismos nitrificantes es un aspecto interesante en la búsqueda posibles aplicaciones biotecnológicas (AHN, 2006).

En este sentido, fenómenos de carácter antropogénico como por ejemplo la eutrofización del agua, debida principalmente al vertimiento de elevadas concentraciones de nitrógeno (inorgánico u orgánico), podrían ser minimizados mediante el uso de microorganismos nitrificantes. Al respecto, algunas de estas aplicaciones biotecnológicas ya comienzan a ser implementadas como etapas previas en la conversión de nitratos en nitrógeno gaseoso (desnitrificación), durante el tratamiento de aguas contaminadas con este elemento (FISHER *et al.*, 1999).

Sin embargo, aún se requiere una mayor comprensión de la diversidad poblacional y del metabolismo de estos microorganismos nitrificantes. Un primer paso en esta dirección podría ayudar a mejorar la selección, utilización y eficiencia de este tipo de bacterias en procesos de depuración de aguas contaminadas con nitrógeno. En el presente estudio se realizó la detección y cuantificación de poblaciones bacterianas nitrificantes con diversos requerimientos nutricionales, asociadas al suelo rizosférico de tres especies de macrófitas obtenidas a partir de un humedal natural de Aguazul, Casanare. Se realizó la recuperación de aislados cultivables a partir de las muestras colectadas y se estimó su potencial nitrificante.

Materiales y métodos

Colección de muestras. Fueron colectadas tres muestras de suelo (~500 g) asociado a la rizósfera de tres especies de macrófitas (*Lemna sp.*, *Eichhornia sp.* y *Bidens sp.*) presentes en un humedal natural cercano a la localidad de Aguazul, Departamento de Casanare, Colombia, en Noviembre de 2013. Las coordenadas de muestreo fueron las siguientes: *Lemna sp.*: 5°0'28.61"N - 72°32'41.32"O, *Eichhornia sp.*: 5°0'31.66"N 72°32'45.66"O y *Bidens sp.*: 5°0'43.21"N - 72°32'57.04"O. Luego de su recolección las muestras fueron y procesadas inmediatamente mediante las técnicas microbiológicas descritas a continuación.

Cuantificación de bacterias nitrificantes. Las bacterias nitrificantes fueron enumeradas mediante la técnica del NMP como describe PAPEN *et al.* (1998). La composición química de los medios empleados para oxidantes de nitrito, modificado de KOOPS *et al.* (2005), fue (g/l): Medio ONL (para litoautotróficos): 0.2 NaNO_2 ; 0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.03 CaCO_3 ; 0.15 KH_2PO_4 ; 0.00015 $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 50(μg) $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.5 NaCl ; 0.1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; pH 8.6. Medio ONH (para heterotrófos): Medio ONL + 0.55 Piruvato de Sodio; 1.5 Extracto de levadura; 1.5 Peptona y sin NaNO_2 . Para bacterias oxidantes de amonio, modificado de ELBANNA *et al.* (2012) (g/l): Medio OAL (para litoautotróficos): 0.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1.0 K_2HPO_4 ; 0.03 $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.3 NaCl ; 0.3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 7.5 CaCO_3 ; medio OAH (para heterotrófos): medio OAL + 1.5 Extracto de levadura; 1.5 Peptona y sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A cada medio fue incorporado el indicador rojo de metilo (0,3%) y el cambio de coloración del medio fue interpretado como resultado positivo. Para el método del NMP fueron establecidas nueve series de diluciones, las cuales fueron inoculadas en sets de 5 pruebas en placas de microdilución, e incubadas de 3 a 6 semanas a 30°C. La determinación de la densidad bacteriana fue establecida tomando las tres últimas pruebas de cada serie de diluciones y estimada mediante el software *MPN calculator (VB6 version)*. (CURIALE, 2004).

Aislamiento de bacterias nitrificantes. A partir de las diluciones establecidas en la etapa anterior, se realizó siembra en superficie en placas de Petri conteniendo medios selectivos para bacterias oxidantes de amonio y nitrito (litoautotróficas y heterotrófas). Para ello, a cada uno de los medios (OAL, OAH, ONL y ONH) fue incorporando agar-agar (18 g/l). Las placas fueron incubadas a 30°C de 3 a 6 semanas, en el caso de los litoautotróficos, y de una a dos semanas en el caso de los heterotrófos. Posteriormente, las colonias generadas fueron recuperadas y reaisladas sucesivamente hasta el establecimiento de cultivos axénicos. Los aislados fueron mantenidos por medio de transferencia periódica en los medios correspondientes.

Evaluación del potencial nitrificante. A partir de cada una de los aislados obtenidos fueron preparadas soluciones stock en solución salina estéril, las cuales fueron ajustadas al estándar 0,5 de turbidez de la escala de MacFarland (KONEMAN *et al.*, 2008). La detección del potencial nitrificante se realizó en medio sólido empleando los medios correspondientes conteniendo el indicador rojo de metilo. Un inóculo de 5 μ l de cada una de las soluciones preparadas fue sembrado sobre la superficie de los medios (dos siembras por placa de petri y dos réplicas por aislado) manteniendo las condiciones de incubación establecidas, luego de la cual fue verificada la presencia de un halo de color rojo, generado por la reducción de pH alrededor del crecimiento de cada aislado. Se realizó la medición de los diámetros de los halos generados. La formación de los productos de oxidación esperados, nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), fue verificada a través del establecimiento de cultivos con cada uno de los aislados en el medio líquido. Para ello, se emplearon erlenmeyers con 200 ml al 2% de inóculo, ajustados al estándar 0,5 de turbidez de la escala de MacFarland (KONEMAN *et al.*, 2008). Los cultivos fueron incubados con agitación constante (150 r.p.m) a una temperatura de 30°C de 3 a 6 semanas, en el caso de los litoautotróficos, y de una a dos semanas en el caso de los heterótrofos. La detección de NO_2^- y NO_3^- fue desarrollada por medio del test *Hanna Instruments HI 83214 COD Meter and Multiparameter Photometer for Wastewater Analysis* y fue registrada como presencia/ausencia del producto de oxidación esperado.

Caracterización de aislados nitrificantes. Para el desarrollo del proceso de identificación, fue realizada una serie de pruebas bioquímicas con el fin de determinar las características metabólicas de los

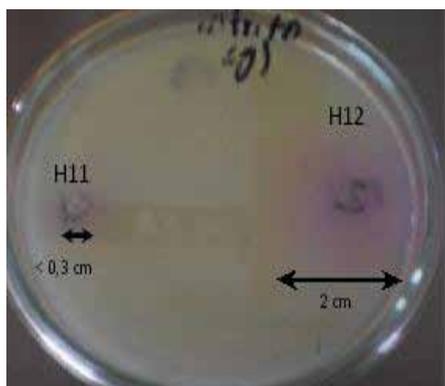


Figura 1. Evaluación semi-cuantitativa del potencial nitrificante mediante medición de diámetros de los halos de acidificación. Para los análisis bioquímicos y de espectrofotometría fueron seleccionados aquellos aislados que presentaron un diámetro de halo igual o superior a 0,5 cm. H11 y H12: Aislados heterotróficos No.11 y 12.

aislados en cuanto a la utilización de azúcares tales como glucosa, fructosa y lactosa; utilización de citrato, producción de sulfuro de hidrógeno, indol, degradación de la urea, presencia de enzimas tales como catalasa y oxidasa y pruebas de motilidad y de gram. Los datos fueron procesados mediante el software *Identax 1.2* (FLORES *et al.*, 2009).

Resultados

Cuantificación y aislamiento de bacterias nitrificantes. Cada una de las muestras fue analizada a nivel microbiológico con la finalidad de estimar la densidad de bacterias nitrificantes (litoautotróficas y heterótrofas) asociadas a la rizósfera de las macrófitas seleccionadas. En la tabla 1 se relacionan los datos obtenidos para cada una de las muestras colectadas en medio líquido, mediante la estimación del número mas probable (NMP/g).

Tras el análisis inicial realizado en medio sólido fueron recuperados y purificados un total de 30 aislados heterótrofos (21 con fenotipo BAO y 9 con fenotipo NOB), 24 aislados litoautotróficos (19 con fenotipo BAO y 5 con fenotipo NOB).

Potencial nitrificante. Con la finalidad de estimar su potencial para la nitrificación, los aislados obtenidos fueron evaluados de manera semi-cuantitativa a través de la medición de halo de acidificación (figura 1), generado esencialmente por la producción de ácidos durante el proceso de nitrificación, tales como HNO_2 y

Tabla 1. Cuantificación de bacterias nitrificantes a partir de suelo rizosférico de las macrófitas seleccionadas.

Rizósfera	Fenotipo	NMP/g	Límite de confianza (95%) NMP/g	
			Inferior	Superior
<i>Lemna spp.</i>	BAO:Het	$3,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^7$
	BAO: Lit	$1,1 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$
	NOB: Lit	$3,6 \times 10^6$	$8,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^7$
	NOB:Het	$4,0 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7$
<i>Eichhornia spp.</i>	BAO:Het	$1,0 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$
	BAO: Lit	$7,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$
	NOB: Lit	$1,8 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$
	NOB:Het	$2,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$
<i>Bidens spp.</i>	BAO:Het	$2,2 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$	$5,9 \times 10^7$
	BAO: Lit	$9,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$
	NOB: Lit	$5,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$
	NOB:Het	$5,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$

BAO: Bacterias oxidantes de amonio; NOB: Bacterias oxidantes de nitrito; Lit: Litoautotróficos; Het: Heterótrofos.

Tabla 2. Características de los aislados seleccionados (Diámetro halo de acidificación, fenotipo e identificación según caracterización bioquímica realizada).

Aislado	D		P		Fenotipo	Género
	BOA	NOB	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻		
NA4	0	1,5	+	-	NOB	<i>Nitrobacter sp.</i>
AA11	1,5	0	-	+	BAO	No determinado
H12	2,5	2	+	+	BAO:NOB	<i>Pseudomonas sp.</i>
H22	3	0	-	+	BAO	<i>Bacillus sp.</i>
H26	0,5	0	-	+	BAO	<i>Staphylococcus sp.</i>
H30	1,8	0	-	+	BAO	<i>Bacillus sp.</i>

D=Diámetro halo de acidificación (cm) ; P=Productos de oxidación detectados tras periodo de incubación

HNO₃, y evidenciado por la presencia en el medio de un indicador de pH (rojo de metilo) (ELBANNA et al., 2012). En la tabla 2 se relacionan los datos obtenidos tras la realización de dicha prueba.

La presencia de los compuestos esperados (amonio ó nitrito) fue detectada y confirmada espectrofotométricamente tras el establecimiento de cultivos en medio líquido (tabla 2).

Caracterización de los aislados nitrificantes obtenidos.

Los aislados que presentaron los fenotipos de interés fueron caracterizados a nivel bioquímico. Los resultados de esta etapa se relacionan en la tabla 2, en la cual se indican los géneros que fueron establecidos preliminarmente por medio de estos métodos

Discusión

Los resultados obtenidos indican que las muestra analizadas no presentan una variación significativa en cuanto a la proporción de bacterias nitrificantes obtenidas. Sin embargo, los grupos fisiológicos detectados presentan diferencias de concentración, encontrándose, por ejemplo, una mayor concentración de bacterias oxidantes de amonio litoautotróficas (BAO), alcanzando valores de hasta $9,4 \times 10^7$ NMP/g. Esto concuerda con diversos análisis realizados en este tipo de ambientes, en donde se evidencia una elevada concentración de bacterias oxidantes de amonio respecto a bacterias oxidantes de nitrito en humedales naturales y artificiales (ELBANNA et al., 2012; CHEN et al., 2009).

Bacterias oxidantes de nitrito (NOB) fueron detectadas en menor proporción (hasta $5,4 \times 10^6$ NMP/g) respecto a BAO. Esta proporción guarda relación en todas las muestras procesadas, lo cual puede relacionarse con su baja tasa de crecimiento y por ende baja concentración en las muestras de suelo rizosférico procesadas. En cuanto a los nitrificantes heterotróficos, se evidencia menor frecuencia en dos de las muestras analizadas, lo cual puede corresponder a una predominancia de bacterias nitrificantes litoautotróficas en éste tipo de hábitat

(ELBANNA et al., 2012; CHEN et al., 2009). Esto se ha evidenciado incluso con el uso de técnicas independientes de cultivo como reporta TESKE et al. (1994) y PURKHOLD et al. (2003).

La prueba desarrollada para la estimación semi-cuantitativa del potencial nitrificante de los aislados es una variación del método descrito por ELBANNA et al. (2012). En el mismo, fueron estimados diámetros de halos de acidificación generados durante el proceso de nitrificación, detectados a través de su difusión en medio sólido en presencia de rojo de metilo como indicador de pH. Esta prueba permitió detectar un total de siete aislados con potencial nitrificante, encontrando ambos fenotipos (BAO y NOB). Respecto a los nitrificantes litoautotróficos fue identificado a nivel bioquímico el género *Nitrobacter sp.* (aislado NA₄), evidenciando asimismo su crecimiento característico en medio suplementado con NO₂⁻. Consecuentemente, este aislado presenta fenotipo NOB como ha sido descrito por WATSON et al. (1989); DEGRANGE et al. (1995). Uno de los aislados litoautotróficos no logró ser identificado mediante la realización de los test aplicados en este estudio. Dicho aislado (AA11) presentó fenotipo BAO al desarrollarse y generar halo de acidificación en medio suplementado con amonio y ser detectado NO₂⁻ en condiciones de cultivo. También fueron detectados un total de cuatro aislados heterótrofos con potencial nitrificante, correspondientes a los géneros *Pseudomonas sp.* (H12), *Bacillus sp.* (H22, H30) y *Staphylococcus sp.* (H26). Estos géneros han sido descritos por STEVENS et al. (2012) como nitrificantes heterótrofos. En el caso de *Pseudomonas sp.*, se evidencia que puede generar nitrato a partir de amonio directamente. Esta actividad, también reportada por STEVENS et al. (2012), es propia de nitrificantes heterótrofos y no de litoautotróficas, los cuales realizan solo una etapa de la nitrificación. En efecto, este tipo de aislados presentan un interés particular para la optimización de la eficiencia de la remoción biológica de nitrógeno. No obstante, posteriores estudios son necesarios para entender su mecanismo de acción y su comportamiento cinético entre otros.

Conclusión

El hábitat en estudio presenta alta concentración de bacterias nitrificantes (BAO y NOB). Por otra parte, los aislados recuperados, tanto litoautotróficos como heterotróficos, evidencian un potencial promisorio para futuros estudios relacionados con la evaluación y optimización de procesos de remoción biológica de nitrógeno.

Agradecimientos

Expresamos nuestro agradecimiento a la Fundación Universitaria de San Gil – UNISANGIL, por ser el ente financiador de este trabajo (proyecto de convocatoria interna CI2013-18). Así mismo, agradecemos a los estudiantes Miguel Molano y Juan Camilo Ortiz por su apoyo en el proceso de colección de muestras.

Referencias

- ADDISCOTT, T. M.; WHITMORE, A. P.; POWLSON, D. S. 2005. Eutrophication; Greenhouse Gas Emissions; Isotopes in Soil and Plant Investigations; Nitrogen in Soils: Cycle; Nitrification; Plant Uptake; Symbiotic Fixation; Pollution: Groundwater. *Soil Use and Management* 9: 86-94.
- AHN, Y.-H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, 41(8): 1709–1721. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.033.
- CHEN, G.-Y.; QIU, S.-L.; ZHOU, Y.-Y. 2009. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic and oligotrophic basins of a shallow Chinese lake (Lake Donghu). *Research in Microbiology* 160(3): 173–178.
- CURIALE, M. 2004. MPN calculator (VB6 version) for food, feed, and water microbiologist. [programa de ordenador]. Disponible en: URL: <http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/>.
- DEGRANGE DEGRANGE, V.; BARDIN, R. 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Applied and environmental microbiology*, 61(6):2093-2098.
- ELBANNA, K. & ATALLA, K.M., 2012. A new simple method for the enumeration of nitrifying bacteria in different environments Kingdom of Saudi Arabia. *Soil plant environmental*, 58(1): 49–53.
- FISHER, J., & ACREMAN, M. C. 1999. Wetland nutrient removal: a review of the evidence. *Hydrology and Earth System Sciences*, 8(4), 673-685.
- FLORES, O.; BELANCHE, L. A.; BLANCH, A. R. 2009. New multiplatform computer program for numerical identification of microorganisms. *Journal of clinical microbiology*, 47(12): 4133-4135.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. 2008. Koneman. *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.
- KOOPS, H. P., PURKHOLD, U., POMMERENING-RÖSER, A., TIMMERMANN, G., & WAGNER, M. 2006. The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. En *The prokaryotes* (pp. 778-811). Springer New York.
- LOBELIA, L.; RISGAARD-PETERSEN, N.; JENSEN, K. 1997. Nitrification and denitrification in the rhizosphere of the aquatic macrophyte *Nitrification Lobelia* and denitrification in the rhizosphere of the aquatic macrophyte, 42(3): 529–537.
- PAPEN, H.; VON BERG, R. 1998. A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant and Soil* 199: 123–130.
- PURKHOLD, U., WAGNER, M., TIMMERMANN, G., POMMERENING-RÖSER, A., KOOPS, H.P. 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel beta proteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1485-1494.
- STEVENS, W. E., DRYSDALE, G. D., & BUX, F. 2002. Evaluation of nitrification by heterotrophic bacteria in biological nutrient removal processes: research in action. *South African journal of science*, 98(5 & 6): 222.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of bacteriology*, 176(21), 6623-6630.
- WATSON, S. W., BOCK, E., HARMS, H., KOOPS, H. P., & HOOPER, A. B. 1989. Nitrifying bacteria. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 3, 1808-1834.