



**Universidad de Concepción**  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Departamento de Oceanografía



# **Enriquecimiento de actividad nitrificante en sedimentos marinos mediante sistemas discontinuos**

**Mayra Andrea Jarpa López**

**Profesor Guía: Dra. Gladys Vidal**

**Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile**

SEMINARIO DE TITULO PRESENTADO A LA FACULTAD DE CIENCIAS  
NATURALES Y OCEANOGRAFICAS PARA OPTAR AL TITULO DE BIOLOGO  
MARINO

Concepción, Chile

*Dedico esta tesis a mi hijo Pablo,  
quien ha sido mi razón para surgir en la vida y a mi padre quien me ha apoyado y  
alentado para seguir adelante*

## INDICE

1.	RESUMEN	7
2.	INTRODUCCIÓN	9
2.1.	Aspectos ambientales de la salmonicultura	9
2.2.	Actividad bacteriana en el ambiente marino	11
2.3.	Ciclo del nitrógeno	12
2.4.	Nitrificación	14
	2.4.1. Antecedentes generales de la nitrificación	14
	2.4.2. Factores que afectan la nitrificación	15
2.5.	Cinética del crecimiento de nitrificantes	18
3.	HIPÓTESIS	20
4.	OBJETIVOS	21
4.1.	Objetivo general	21
4.2.	Objetivos específicos	21
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1.	Toma de muestras	22
5.2.	Preparación de los medios de cultivo	22
5.3.	Cultivos de bacterias en batch	24
5.4.	Determinación de actividad nitrificante	25
5.5.	Determinación de sólidos suspendidos volátiles	26
5.6.	Recuento en placas	27
5.7.	Métodos analíticos	27
	5.7.1. Determinación de amonio	27
	5.7.2. Determinación de nitrito	28
	5.7.3. Determinación de nitrato	30
	5.7.4. Determinación electrométrica de pH	32
	5.7.5. Determinación de oxígeno disuelto	32
6.	RESULTADOS	34
6.1.	Determinación de las cinéticas de cultivo	34
6.2.	Determinación de biomasa de los cultivos	38
6.2.1.	Determinación de sólidos suspendidos volátiles en los cultivos	38
6.2.2.	Recuento de colonias	38

6.3.	Actividad nitrificante	40
7.	DISCUSIÓN	43
7.1.	Aislamiento de bacterias nitrificantes	43
7.2.	Actividad nitrificante	45
8.	CONCLUSIONES	47
9.	BIBLIOGRAFÍA	48

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Bacterias nitrificantes	14
<b>Tabla 2.</b> Medio de cultivo para bacterias nitritadoras	22
<b>Tabla 3.</b> Medio de cultivo para bacterias nitratadoras	23
<b>Tabla 4.</b> Cultivos	24
<b>Tabla 5.</b> Conversión de concentración a volumen	29
<b>Tabla 6.</b> Caracterización del desarrollo de los cultivos	37
<b>Tabla 7.</b> Recuento en placas	39
<b>Tabla 8.</b> Valores de respirometría para bacterias nitritadoras	40
<b>Tabla 9.</b> Valores de respirometría para bacterias nitratadoras	40
<b>Tabla 10.</b> Velocidad de consumo oxígeno de los cultivos de bacterias nitritadoras y bacterias nitratadoras	41

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico del nitrógeno	13
<b>Figura 2.</b> Curva típica del crecimiento bacteriano	19
<b>Figura 3.</b> Sistema de incubación bacterial implementado en los experimentos	25
<b>Figura 4.</b> Consumo de amonio y generación de nitritos del cultivo 1	35
<b>Figura 5.</b> Consumo de amonio y generación de nitritos del cultivo 2	35
<b>Figura 6.</b> Consumo de nitrito y generación de nitratos del cultivo 3	36
<b>Figura 7.</b> Consumo de nitrito y generación de nitratos del cultivo 4	37
<b>Figura 8.</b> Relación consumo neto de oxígeno entre ambos grupos de bacterias nitrificantes	42

## 1. RESUMEN

El aumento del cultivo de salmones en el mar a tenido importantes consecuencias para el ambiente marino, aunque la mayoría de los efectos hasta el momento no han sido cuantificados por el hecho de estar a grandes profundidades, como es el caso de los sedimentos marinos.

A lo largo del proceso productivo del salmón, se van eliminando una serie de contaminantes, los cuales contribuyen a un exceso de materia orgánica. Al degradarse esta materia, se genera una gran cantidad de nutrientes, los cuales permiten un aumento en la producción primaria y en algunos casos eutroficación. Hay compuestos que al ser degradados pueden ser tóxicos para cierto tipo de organismo, como es el caso del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), por lo que resulta de gran importancia el rol que ocupan las bacterias nitrificantes en el ciclo del nitrógeno, ya que son las responsables de la oxidación de estas formas tóxicas a formas asimilables por los distintos organismos que habitan en el mar. Por lo antes descrito, el objetivo general de este trabajo es obtener un cultivo enriquecido y evaluar su actividad nitrificante, considerando como inóculo inicial un sedimento proveniente de un centro de cultivos de salmones. Para cumplir este objetivo se realizaron cultivos batch a escala laboratorio con la finalidad de enriquecer el sedimento muestreado, a través de la alimentación de un sustrato rico en nutrientes nitrogenados y sales inorgánicas.

Se evaluó la cinética de eliminación de los sustratos suministrados, mediante las técnicas analíticas de espectrofotometría, potenciometría y respirometría. Al mismo tiempo, se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a fin de evaluar el estado del cultivo.

Los resultados obtenidos indicaron que los consorcios bacterianos de los distintos cultivos presentaron bajas velocidades de crecimiento, debido a ello, se detectaron producciones de nitritos de 197 – 206 mg N- $\text{NO}_2^-$ /L para el caso de bacterias nitritadoras, mientras que para las nitratadoras producciones de 404 - 631 mg N- $\text{NO}_3^-$ /L.

En la respirometría realizada para bacterias nitrificadoras, se observa que los mayores consumos de oxígeno, se registraron a la concentración más baja, la cual fue de 50 mg N/L, con consumos de 1,09 mg O<sub>2</sub>/L y velocidades de consumo de oxígeno (VCO) de 0,08 mg O<sub>2</sub>/L·min, determinándose un consumo neto de oxígeno (CNO) de 0,055 mg O<sub>2</sub>/L·min. A medida que aumenta la concentración del sustrato, la capacidad de las bacterias para oxidar compuestos fue disminuyendo. Lo mismo se explica para las respirometrías realizada a bacterias nitrificadoras, con la diferencia que estas presentan consumos de oxígeno inferiores, siendo de 0,32 mg O<sub>2</sub>/L con VCO de 0,031 mg O<sub>2</sub>/L·min y un CNO de 0,0122 mg O<sub>2</sub>/L·min.

Los bajos valores obtenidos tanto en la generación de productos finales, aumento en biomasa y ensayos respirométricos, corroborarían la baja tasa de crecimiento que presentan las bacterias nitrificantes.

Por medio de este estudio se puede concluir que las bacterias presente en los sedimentos, poseen una baja actividad nitrificante. Aunque los cultivos se realizaron bajo condiciones óptimas de laboratorio, las bacterias nitrificantes, no fueron capaces de oxidar eficientemente las concentraciones suministradas durante los cultivos, debido a lo cuál, se podría concluir que los sedimentos del fondo marino son incapaces de oxidar la gran cantidad de compuestos nitrogenados, generados por esta actividad acuícola.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Aspectos ambientales de la salmonicultura**

Durante la última década, Chile ha experimentado un crecimiento exponencial en el desarrollo del cultivo de salmón, convirtiéndose en uno de los principales productores a nivel mundial (Pizarro, 2006).

La salmonicultura se da preferentemente en las regiones X y XI, dado las características geográficas y oceanográficas que estas zonas presentan, siendo lugares propicios para dicha actividad. Su aumento a influido directamente en el medio ambiente donde se desarrolla y pese a la gran amplitud y magnitud de sus efectos ambientales, el conocimiento de esto en Chile es vago en la mayoría de los casos, dado que muchas veces esta basado en estudios que no cumplen con estándares técnicos que permitan dar cuenta real de la situación ambiental (Buschmann *et al.*, 1996; Buschmann, 2001).

Dentro de las fuentes de contaminación se puede mencionar, el uso indiscriminado de antibióticos en comparación a otros países, debido a que no sólo se les suministra a los peces enfermos, sino que también a los sanos, creando una resistencia a futuros medicamentos. Sin embargo, el uso de antibióticos ha ido experimentando cambios, se esta pasando de una suministración indirecta (por medio de alimentos y masa de agua), a un uso directo, mediante vacunas. Además se registran impactos por los desechos orgánicos de peces y los residuos de la alimentación, cuyo efecto principal es la eutroficación de las aguas (Claude & Oporto, 2000). El aumento de nutrientes afecta directamente a la producción de salmónes, permitiendo el aumento en la frecuencia e intensidad de las afloraciones de algas, las cuales al concluir su ciclo, sedimentan y se acumulan en el fondo (Salamanca, 2006). Algunos tipos de algas son responsables de la fabricación de una especie mucosidad, la cual puede recubrir las agallas de los salmónes, causándoles infecciones, hemorragias, sofocación y muerte, lo cual significa grandes pérdidas para la industria salmonera.

El aporte de materia orgánica, en situaciones extremas puede permitir acumulación de sedimentos anóxicos y sulfurosos bajo los centros acuícolas, siendo este un problema de

tipo localizado, debido a que la contaminación se sitúa justo bajo las balsas-jaulas de cultivo, estas condiciones extremas, producen una disminución de la diversidad de especies, donde solamente pueden permanecer especies que son capaces de tolerar dichas condiciones. La generación de sedimentos anóxicos se encuentra controlada por las condiciones oceanográficas, morfológicas y corrientes del sitio en cuestión, como también de la distancia entre el fondo marino y la balsa jaula (Buschmann *et al.*, 1996).

Estudios realizados sustentan que cada tonelada que produce la industria salmonera genera 2,5 toneladas de residuos por concepto de alimentos, donde aproximadamente se encuentra un desperdicio de 9,8 kg fósforo y 78 kg nitrógeno, que no son aprovechados por los peces en cultivo, lo que implica que el cuerpo de agua aumente su productividad debido al incremento en el ingreso de nutrientes. Si el factor se aplica a las más de 200 mil toneladas de salmones que Chile produce al año, es fácil deducir los impactos que puede provocar la salmonicultura en el ambiente (Buschmann *et al.*, 2001).

Soto (2002), cuantificó las concentraciones de nitrógeno disuelto en aguas de lagos oligotróficos continentales (lago Llanquihue y Rupanco) y en Chiloé (lago Natri y Huillinco). Realizó análisis de sitios impactados, como también de sitios controles. Los datos demostraron una tendencia a aumentar las concentraciones de nitrógeno disuelto en sus aguas, indicando que algunos lagos continentales alcanzaban valores más altos que los señalados en estudios realizados previamente, sugiriendo que la salmonicultura, tiene una influencia mayor a la señalada.

De igual forma Buschmann (2002) realizó estudios en zonas costeras del Sur de Chile, en sitios impactados y sitios controles, cuyos datos obtenidos no mostraron un aumento de compuestos nitrogenados inorgánicos disueltos en la columna de agua asociados a la salmonicultura, sin embargo, la zona de la costa Este de Chiloé presentó mayores concentraciones, específicamente en la zona de Reloncaví, obteniendo valores de 0,1-1,0 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L en las zonas controles, bajo balsas jaulas 0,1-1,4 N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L y 0,1-0,4 N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L en agua intersticial bajo balsas jaulas. Las cantidad de nitrógeno registradas en las zonas

costeras, se podría deber a escurrimientos costeros, lo que explicaría los aumentos de nitritos en fiordos y canales.

Troell *et al.*, (1997) realizó experimentos con algas instaladas en las proximidades de balsas jaulas, indicando que los contenidos de nitrógeno aumentaban significativamente, lo cual señala que las instalaciones de salmones son una fuente concreta de nutrientes para el medio.

## **2.2. Actividad bacteriana en el ambiente marino**

Normalmente los ambientes acuáticos pueden metabolizar residuos orgánicos, mediante la acción de colonias bacterianas que habitan tanto en la columna de agua, como también en los sedimentos marinos, siendo en gran parte las encargadas del reciclamiento de nutrientes en el mar. La degradación de esta materia orgánica, les permite obtener los nutrientes necesarios para su normal desarrollo y aumento en biomasa (Pantoja *et al.*, 2004). Estas bacterias se encuentran altamente especializadas en lo que se refiere a utilización de nutrientes, por lo que es posible diferenciar entre aquellas de tipo heterotróficas y bacterias de tipo autótrofas.

Las bacterias heterotróficas en esta zona, son las encargadas de la descomposición de la materia orgánica, produciendo nutrientes inorgánicos (i. e., nitrógeno y fósforo) en la forma soluble, permitiendo en gran parte el proceso de mineralización o regeneración de nutrientes, lo cual es de suma importancia en el sistema marino. Su capacidad para asimilar las diversas sustancias dependerá de la especie en cuestión y de diferentes factores ambientales dentro de los que se pueden mencionar la temperatura, salinidad, presión, etc. Estas bacterias sólo pueden utilizar sustancias disueltas, por lo tanto, la materia que aparece en forma de partículas, debe ser disuelta previamente por enzimas extracelulares, lo que finalmente les permitirá su utilización.

A diferencia de lo antes descrito están aquellas bacterias que requieren de una fuente de carbono inorgánico para su desarrollo, son las de tipo autótrofas, pudiendo encontrar en ellas las bacterias fotosintetizadoras, es decir aquellas que requieren de luz para activar sus

cloroplastos y así poder sintetizar moléculas orgánicas y las bacterias quimiolitotróficas, las cuales utilizan componentes inorgánicos reducidos como fuente de energía, para la reducción de CO<sub>2</sub> en carbono orgánico (Campbell *et al.*, 1966) y el resto de los elementos a partir de sales minerales (Rittenberg, 1969).

Tanto las bacterias heterótrofas como las autótrofas (fotosintetizadoras y quimiolitotróficas), requieren de un medio con oxígeno, utilizándolo como aceptor final de electrones.

### **2.3. Ciclo del nitrógeno**

El nitrógeno resulta ser fundamental para la vida ya que es un componente básico para las proteínas. La Figura 1 muestra las etapas principales del ciclo del nitrógeno.

Este ciclo consta de varias etapas, siendo la primera la amonificación en la cual se produce la conversión del nitrógeno orgánico (i.e. proteínas) en amoníaco. A continuación ocurre el proceso de nitrificación, en el cual el amoníaco es oxidado por medio de bacterias a nitrito y nitrato, siendo esta una etapa de gran importancia, ya que el amoníaco en concentraciones altas resulta ser tóxico para la vida acuática. En ausencia de oxígeno se produce la desnitrificación, en la cual el nitrato es reducido a nitrito, donde sus productos finales son el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) o nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>), esta vía constituye la pérdida de nitrógeno gaseoso para el océano. La capacidad de las bacterias de reducir el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a N<sub>2</sub>O ó N<sub>2</sub> ocurre cuando están en presencia de bajos niveles de oxígeno (Knowles, 1982). En esta etapa el aceptor final de electrones es el nitrato en lugar de oxígeno para su respiración, por lo cual para que se lleve a cabo, será necesario que el medio no cuente con oxígeno libre (Capone, 2000).

Una vez que el nitrato es agotado en la columna de agua o en los sedimentos, comienzan a predominar las bacterias reductoras de sulfato, las cuales utilizan sulfato, tiosulfato o azufre elemental como aceptor de electrones (Pantoja *et al.*, 2004).



Dentro del grupo de bacterias nitrificantes es posible encontrar la familia *Nitrobacteraceae* (Bergey`s, 1989). Son las responsables de la oxidación biológica del  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ . La mayoría de las especies son Gram (-), sus tamaños varían entre 0,3-2,5  $\mu\text{m}$ , algunas presentan movilidad y son del tipo quimiolitotróficas (Campbell *et al.*, 1966), aunque hay algunas excepciones como las *Nitrobacter Winogradsky*, las cuales pueden crecer quimioheterotróficamente, el resto son quimiolitotrofas obligadas. Habitan en distintos tipos de hábitat que van desde los suelos, aguas frescas y ambientes marinos (columna de agua y sedimentos) y en su mayoría en ambientes aeróbicos. En la tabla 1 se muestran bacterias que oxidan amonio y nitrito.

Tabla1. Bacterias nitrificantes

Oxidación de amonio	Oxidación de nitrito
<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrobacter Winogradskyi</i>
<i>Nitrosococcus nitrosus</i>	<i>Nitrospina gracilis</i>
<i>Nitrosococcus oceanus</i>	<i>Nitrococcus mobilis</i>
<i>Nitrosovibrio tenuis</i>	<i>Nitrobacter agilis</i>
<i>Nitrospira briensis</i>	
<i>Nitrosococcus mobilis</i>	

De todas las especies nitrificantes mencionadas, sólo dos géneros han sido los más estudiados, ya que son las que comúnmente han sido encontradas y corresponden a *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

La oxidación total del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), por medio de estas bacterias ocurre en dos etapas:

1ª Etapa



2ª Etapa



En el caso de la primera etapa se produce la oxidación del amonio a nitrito, por lo que se le conoce como nitrificación (1) y es generado por las *Nitrosomonas* y la segunda etapa se produce la oxidación de nitrito a nitrato por la acción de las *Nitrobacter*, denominándose nitratación (2). En ambas reacciones hay desprendimiento de energía, la cual es utilizada por las bacterias para su crecimiento y mantenimiento celular, obtenida a partir de fuentes de carbono inorgánico como dióxido de carbono, bicarbonato y carbonato. Pero esta energía resulta ser baja, lo cual repercute en su tasa de crecimiento, siendo demasiado lenta.

#### 2.4.2. Factores que controlan el proceso de nitrificación

Existen una serie de factores que afectan el proceso de nitrificación, entre los cuales es posible mencionar los siguientes:

a) pH: es la forma de medir la concentración de iones de hidrógeno en una solución. El crecimiento de las bacterias nitrificantes en cultivo esta determinado por este tipo de variable, presentando un efecto significativo. El efecto del pH sobre este tipo de bacterias se puede desglosar en tres etapas.

-Activación-desactivación: etapa en la cual esta asociado el equilibrio entre iones  $H^+$  y  $OH^-$ . El valor de pH óptimo para las bacterias tanto del género *Nitrosomonas* como *Nitrobacter*, se encuentra entre 7,5-8,5.

-Nutricional: ligada a la alcalinidad del medio. Este estado se debe a la forma en que se puede encontrar en el medio el carbono mineral, siendo este el sustrato básico de los organismos quimiolitotróficos. De modo que el equilibrio químico es en función del pH.



-Inhibición del proceso: producto de sustancias cuya concentración es en función del pH (amoníaco libre, ácido nitroso libre y metales pesados).

b) Temperatura: es un parámetro que influye directamente sobre el proceso de nitrificación, afectando tanto su velocidad de crecimiento como también la constante de saturación. Los microorganismos nitrificantes son muy sensible a los cambios bruscos de temperatura, por dicha razón requieren de un tiempo de aclimatación para alcanzar valores estables

c) Oxígeno disuelto (OD): el crecimiento de las bacterias nitrificantes esta controlado por la cantidad de oxígeno disuelto presente en el medio, ya que estas son bacterias del tipo aerobio y para su normal desarrollo requieren de él, además puede ser considerado como un sustrato limitante para ellas, es decir el OD determina la oxidación del nitrógeno amoniacal pasando a nitritos y finalmente a nitratos cuyas transformaciones solamente ocurren en medios que contengan bastante OD. Las bacterias nitrificantes son más sensibles a las concentraciones de OD que las bacterias heterótrofas, por lo que podría hacer disminuir considerablemente su crecimiento en cultivos no puros. La disminución del OD les influye directamente, ya que les impide la acumulación de nitritos en el medio, y de igual forma disminuye las velocidades de crecimiento, desapareciendo para valores de oxígeno inferiores a 0,5 mg O<sub>2</sub>/L, por el contrario, si en el medio existe una alta concentración de oxígeno, este no presenta algún efecto significativo sobre el cultivo, ya que la nitrificación puede ser llevada de igual forma, incluso se han reportado con 60 mg O<sub>2</sub>/L, sin inhibición del proceso. La velocidad máxima de crecimiento se obtiene con concentraciones de oxígeno de 7 mg O<sub>2</sub>/L. Estequiométricamente para oxidar 1g de nitrógeno amoniacal, se requieren 4,57 g de oxígeno.

d) Concentración de sustratos: esta puede resultar perjudicial para el normal desarrollo de su cinética de crecimiento. El crecimiento de *Nitrosomonas* se encuentra limitado por la concentración de amonio y para el caso de *Nitrobacter*, su crecimiento esta limitado por la concentración de nitrito presente en el medio de cultivo.

e) Tóxicos e inhibidores: se habla de inhibidores del crecimiento bacterial, a la presencia de microorganismos distintos a las bacterias nitrificantes, además de la concentración en la cual se encuentren en el medio. Es por esto que resulta de gran importancia bajo estas

condiciones la concentración de bacterias nitrificantes que hay en el medio, como también del modo, duración de la exposición, el régimen de mezcla y si las condiciones de operación son las adecuadas o no, para el normal desarrollo de éstas.

Dependiendo de todo lo antes descrito, el efecto tóxico puede ser parcialmente inhibitorio para las bacterias nitrificantes con lo cual continúan creciendo, pero oxidando el amonio a una menor velocidad. En el caso que el efecto sea altamente tóxico, pueden existir dos rutas para estas bacterias, aunque en ambas se detiene la actividad bacterial, ya que en algunos casos esta inhibición puede ser detenida, permitiendo que las bacterias comiencen a crecer nuevamente o hasta el punto de producir la inactivación de los microorganismos nitrificantes.

Diversos estudios con respecto a sustancias inhibitorias para el crecimiento de las bacterias nitrificantes, han permitido establecer que dentro de las sustancias más tóxicas es posible mencionar la tiurea, cianuro, compuestos de nitrógeno (anilina) y algunos metales (cobre, cromo, plata, mercurio, entre otros).

f) Interacción entre bacterias nitrificantes y heterótrofas: existe una competencia entre bacterias del tipo autótrofas como heterótrofas, ya que ambas requieren de oxígeno disuelto y espacio. Aunque algunas veces estas interacciones resultan no ser perjudicial, según ha sido demostrado por algunos estudios, ya que se ha podido determinar que las bacterias heterótrofas son capaces de producir ciertos compuestos que pueden estimular a las bacterias nitrificantes. Además, pueden degradar sustancias que para las bacterias nitrificantes resultan ser inhibitorias y en el caso de las bacterias nitrificantes, ellas producen y eliminan productos microbiológicos solubles aumentando de esta forma el sustrato para las heterótrofas.

## **2.5. Cinética del crecimiento de nitrificantes**

De acuerdo a la Figura 2, se pueden distinguir cuatro fases en el crecimiento de bacterias en cultivos realizados en sistemas discontinuos o batch.

-Fase de retardo: En esta fase los microorganismos necesitan de un tiempo para adaptarse a las características del cultivo, se produce inmediatamente después de inoculado el cultivo.

-Fase de crecimiento exponencial: Tiene lugar en un medio en el cual las bacterias se encuentran ante un exceso de alimento, las bacterias se encuentran en plena reproducción a una velocidad que es la máxima. La tasa de crecimiento dependerá casi exclusivamente de las bacterias disponibles para asimilar el sustrato.

-Fase estacionaria: La población permanece constante debido a que se agota el sustrato, razón por la cual se detiene el crecimiento.

-Fase de muerte: Durante esta fase la tasa de mortalidad excede la tasa de generación de células nuevas, ya que por falta de sustrato, las bacterias metabolizan su propia materia celular.

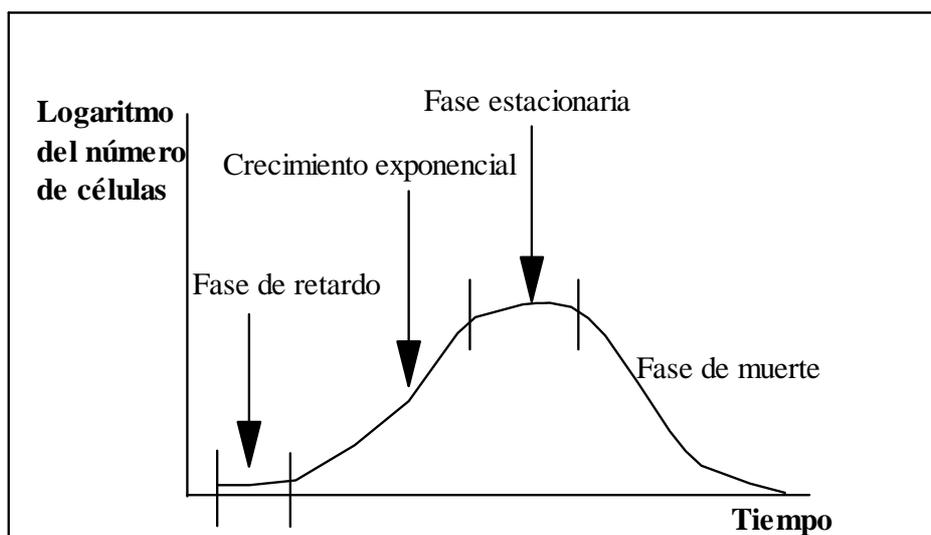


Figura 2. Curva típica de crecimiento bacteriano en sistema batch.

En cultivos de bacteria nitrificantes, es posible determinar las velocidades de consumo de sustrato, tanto para bacterias nitritadoras como también para bacterias nitratadoras.

$$r_{\text{NH}_4^+} = \frac{\text{VCO}}{f} \quad (4)$$

donde:

$r_{\text{NH}_4^+}$ : velocidad de consumo de amonio (mg /L·min)

VCO: velocidad de consumo de oxígeno (mg/L·min)

F: factor estequiométrico para bacterias nitritadoras

Esta velocidad de consumo se puede expresar también para bacterias nitratadoras. El factor estequiométrico registrado en estudios previos, para el caso de bacterias nitritadoras corresponde a 3,43 g O<sub>2</sub>/g N, mientras que para nitratadoras es 1,14 g O<sub>2</sub>/g N (Sánchez, 1996). Si estas respectivas velocidades de consumo se dividen por la concentración de la biomasa (g SSV/L) presente en los cultivos, se obtienen las respectivas actividades nitrificantes.

### **3. HIPÓTESIS**

$H_0$ : Es posible enriquecer un sedimento proveniente de un centro de cultivo de salmones, para aumentar la actividad nitrificante presente en dicho sedimento.

$H_1$ : No es posible enriquecer un sedimento proveniente de un centro de cultivo de salmones, para aumentar la actividad nitrificante presente en dicho sedimento.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Obtener un cultivo enriquecido y evaluar su actividad nitrificante considerando como inóculo inicial, sedimento proveniente de un centro de cultivos de salmones.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Obtener cultivos de bacterias nitrificantes enriquecidos partiendo de un sedimento proveniente de un centro de cultivos de salmones.
  
- Evaluar la actividad nitrificante presente en un sedimento enriquecido.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Toma de muestras en el ambiente natural

Consortio bacteriano. Las bacterias utilizadas para la realización del cultivo in vitro fueron obtenidas de sedimentos superficiales bajo balsas jaulas de centros de mar. Una vez extraídas las muestras de sedimentos, se trasladaron en recipientes herméticos al laboratorio de biotecnología del Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile.

### 5.2. Preparación de los medios de cultivo

a) Medio de cultivo. Debido a las etapas de la nitrificación, se elaboraron dos medios de cultivos, uno para las bacterias nitrificadoras y otro medio para las bacterias nitrificadas.

-Medio de cultivo para las bacterias nitrificadoras. En la tabla 2, se muestra el medio de cultivo utilizado para bacterias nitrificadoras, encargadas de la oxidación del amonio a nitrito.

Tabla 2. Medio de cultivo para bacterias nitrificadoras

Reactivo	Concentración(g)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5
NaCl	2,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{CaCO}_3$	6,0
Rojo fenol (0,5%)	0,01
Agua destilada	1L
pH	7,6

Fuente: Austin, 1990

- Medio de cultivo para las bacterias nitrificadoras. En la tabla 3, se muestra el medio de cultivo utilizado para las bacterias nitrificadoras, encargadas de la oxidación del nitrito a nitrato.

Tabla 3. Medio de cultivo para bacterias nitrificadoras

Reactivo	Concentración(g)
NaNO <sub>2</sub>	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15
NaCl	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> X 2H <sub>2</sub> O	0,0005
FeSO <sub>4</sub> X 7 H <sub>2</sub> O	0,00015
CaCO <sub>3</sub>	0,007
MgSO <sub>4</sub> X 7 H <sub>2</sub> O	0,05
Agua destilada	1 L
pH	8,6

Fuente: Austin, 1990

b) Procedimiento. Para la elaboración de ambos medios de cultivo, es necesario contar con una balanza de tipo analítica, permitiendo así realizar una pesada más exacta de los constituyentes de cada medio.

Una vez que cada compuesto ha sido pesado, deben ser agregados a un matraz, adicionando 1L de solvente. Este solvente deberá estar en una proporción de 400:600 ml de agua de mar y agua destilada respectivamente. Todo el contenido de cada matraz debe ser agitado para que se realice la mezcla de todos los constituyentes.

Una vez elaborado cada medio de cultivo, se debe controlar el pH, para el caso de las nitrificadoras deberá ser 7,6 y para las nitrificadoras 8,6. De no encontrarse en dichos valores es necesario ajustar, agregando una base o un ácido según sea el caso. Realizado este ajuste, el medio deberá ser esterilizado en autoclave por un período de 15 min a 121 °C. Finalizado el autoclavado los matraces son puestos a temperatura ambiente para que disminuya la

temperatura del medio, permitiendo de esta forma que sean guardados hasta su posterior utilización.

### 5.3. Cultivo de bacterias en batch

Los cultivos de bacterias se realizaron en sistemas batch, los cuales operan de forma discontinua, ya que los nutrientes ingresan por medio de una corriente de alimentación, pero no existe una corriente de descarga, lo que provoca variaciones en el volumen del sistema.

Para una mayor representatividad de los resultados, se implementaron 4 sistemas batch, de los cuales 2 corresponden a cultivos con amonio como elemento principal del sustrato y los otros 2 cultivos, con nitrito elemento principal del sustrato (Tabla 4).

Tabla 4. Cultivos

Batch	Medio de cultivo alimentado	Evaluación actividad	Denominación en el texto
1	Tabla 2	Bacterias nitritadoras	Cultivo 1
2	Tabla 2	Bacterias nitritadoras	Cultivo 2
3	Tabla 3	Bacterias nitradoras	Cultivo 3
4	Tabla 3	Bacterias nitradoras	Cultivo 4

Se utilizaron matraces de 500 ml para construir cada cultivo, y a cada matraz se le agregó 200 ml de medio de cultivo, dependiendo de la experiencia a realizar (nitritadoras y nitradoras), más un inóculo de sedimento (5 ml) proveniente del centro de mar.

Debido a los requerimientos ambientales que estas bacterias necesitan para su normal desarrollo, fue necesario crear un ambiente totalmente cerrado (cámara de incubación), lo cual permitió que estas bacterias fueran incubadas a oscuridad, con un rango de temperatura entre 25-30°C y aireación continua por medio de mangueras conectadas a una bomba de aireación (Figura 3).



Figura 3. Sistema de incubación bacterial para enriquecer un cultivo de nitrificantes.

Para la obtención de muestras de bacterias nitrificantes de cada cultivo, era necesario desconectar cada sistema de la cámara de incubación, sacar el sistema de tapón e introducir una jeringa, extrayendo 10 ml de inóculo, los que se utilizaron para los respectivos análisis.

A fin de evitar la existencia de sólidos en suspensión que puedan sesgar los resultados, se utilizó un filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

#### **5.4. Determinación de actividad nitrificante**

La respirometría es una técnica basada en la medición e interpretación de la velocidad de consumo de oxígeno por parte de microorganismos, los cuales se encuentran bajo condiciones experimentales. La cantidad de oxígeno consumido depende, tanto de la concentración de biomasa existente, como también de la cantidad de sustrato disponible para ser degradado. Esta técnica presenta una serie de ventajas dentro de las que se pueden mencionar los bajos períodos de tiempo que requieren sus análisis y su amplia aplicación

Para determinar la tasa de consumo de oxígeno por medio de esta técnica analítica fue necesario contar con:

-Monitor biológico de oxígeno YSI 5300

-Baño estándar YSI 5300

-Sensor de oxígeno

-Muestras de sedimento bacteriano

-Procedimiento: Es necesario contar con biomasa nitrificante, por lo que se utiliza una cierta cantidad de los cultivos implementados. Antes de realizar el respirograma, es necesario calibrar el sensor de oxígeno mediante la concentración de oxígeno inicial presente en una muestra de agua determinada (aprox 8 mg O<sub>2</sub>/L). Para realizar los respectivos respirograma, se debe introducir el oxímetro al vial del ensayo, el cual se mantiene termostatizado a 22°C. El oxígeno disuelto se mide con el sensor de oxígeno, el cual se encuentra conectado a un monitor biológico de oxígeno que registra el %O<sub>2</sub>/L.

Primero se realizan ensayos al lodo sólo, el cual corresponde al blanco, lo que permite determinar el consumo endógeno de oxígeno y posteriormente se inyecta en el vial distintas concentraciones de sustrato. El sustrato para cada tipo de bacterias nitrificante debió ser diferente, siendo elaborado en base de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para bacterias nitritadoras, mientras que para bacterias nitradoras, se elaboró en base a NaNO<sub>2</sub>, de los cuales se prepararon 5 concentraciones para cada caso (50mg N/L, 100mg N/L, 150mg N/L, 250mg N/L, 500mg N/L), obteniéndose los respectivos respirogramas. Cada análisis de consumo de oxígeno se realizó por períodos de 15 min. Durante este tiempo, se registraron los mg O<sub>2</sub>/L, cada 15 segundos.

Cada ensayo fue realizado por triplicado, de los cuales se calcularon promedios para cada medición.

### **5.5. Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)**

La medida de SSV es una aproximación de la concentración de biomasa presente en el cultivo. Previo a la determinación de SSV, es necesario determinar los sólidos totales (ST) de la muestra. Para esto se tomó un volumen conocido de muestra, el cual fue puesto en una capsula de porcelana, y puesto a evaporar y secar en una estufa a 103-105°C hasta peso

constante durante 24h. Posteriormente se retira la capsula de la estufa y se coloca en el desecador para luego pesar. Una vez que se obtiene el valor de ST, la capsula con la muestra, debe ser calcinada a 550°C hasta peso constante, luego se retira, se coloca en el desecador y finalmente se pesa. La perdida de peso que experimenta la muestra al ser calcinada a 550°C, corresponde a la cantidad de SSV de la muestra.

## **5.6. Recuento en placas**

Este método se utiliza para el recuento de bacterias viables heterótrofas de un cultivo, pero en este experimento se implementó para cuantificar el número de colonias/ml que hay en cada cultivo de bacterias nitrificantes, para lo cual es necesario utilizar un medio sólido selectivo. En este caso se utilizó el mismo medio empleado para la alimentación de los sistemas de cultivos (Tabla 2 y 3).

- Procedimiento: Se extrae una muestra de 1 ml de cada cultivo y se realizan diluciones hasta el nivel que sea necesario, lo que dependerá de la carga microbiana presente en los cultivos. De cada dilución se extrae 0,1 ml, el cual es puesto en la placa petri con medio correspondiente para cada caso, es decir, se cuentan con placas con medios para nitrificadoras y nitradoras. El inóculo debe extenderse con un asa de vidrio en ángulo recto, la cual debe ser impregnada en alcohol y pasada por el mechero antes de cada uso. Realizada la siembra, la placa se debe invertir e incubar por un período de 72 h, pasado dicho período se procede a contabilizar las colonias, siendo necesario seleccionar aquellas placas que presenten un crecimiento entre 30 y 300 colonias aproximadamente. Finalmente se registra el nivel de dilución y el número de colonias por placa.

## **5.7. Métodos analíticos**

### **5.7.1. Determinación de amonio**

-**Método del fenol.** El indofenol es un compuesto de azul intenso que se forma por la reacción del amonio, hipoclorito y el fenol catalizado por el nitroprusiato de sodio. Para la determinación de amonio es necesario elaborar un complejo de magnesio y calcio con citrato eliminándose de esta forma las interferencias producidas por la precipitación de estos iones a pH elevado. No hay interferencia de otras formas trivalentes de nitrógeno.

#### a) Reactivos

-Solución madre de amonio. Disolver 3,819 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  anhidro, secado a 100 °C, en 1 L de agua destilada 1,00 ml = 1,00 mg N = 1,2 mg  $\text{NH}_3$ .

-Patrones. Realizar la curva de calibrado preparando patrones entre 0 y 1 mg/L de N- $\text{NH}_3$  a partir de la solución madre de amonio.

-Solución de fenol. Mezclar 11,1 ml de fenol ( $\geq 89\%$ ) con alcohol etílico al 95% hasta un volumen total de 100 ml.

-Nitroprusiato de sodio, 0,5 %. Se deben disolver 0,5 g de nitroprusiato de sodio en 100 ml de agua destilada.

-Citrato sódico. Disolver 200 g de citrato trisódico y 10 g de hidróxido sódico en 1 L de agua destilada.

-Hipoclorito de sodio, solución comercial del 5 %. Esta solución se descompone muy rápidamente una vez abierta la botella. Reemplazar cada dos meses.

-Solución oxidante. Mezclar 100 ml de citrato sódico con 25 ml de hipoclorito sódico. Preparar diariamente.

#### b) Procedimiento

Se deben tomar 2,5 ml de muestra, y añadir 0,1 ml de solución de fenol, 0,1 ml de nitroprusiato de sodio, y 0,25 ml de solución oxidante. Es necesario agitar después de cada adición. Estas muestras deben cubrirse o dejarse a luz tenue a temperatura ambiente durante 1 h, período en el cual se desarrolla el color. El color es estable durante 24 h. A continuación se mide la absorbancia a 640 nm mediante espectrofotometría y se determina la cantidad de amonio presente en cada muestra.

### 5.7.2. Determinación de nitrito

Para determinar la concentración de nitrito en cada muestra, se utiliza el método analítico de espectrofotometría.

#### a) Reactivos:

-Agua exenta de nitrito. Se debe contar con agua redestilada o destilada, desionizada, de la máxima pureza para preparar todas las soluciones y disoluciones.

-Solución patrón de nitrito. A partir de una solución estándar de nitrito de 1000 mg/L, se preparará una solución estándar de nitrito de 50 mg/L. Debido a los bajos volúmenes que se requerirán para análisis posteriores será necesario preparar un volumen de 100 ml. Para lo cual en un matraz aforado de 100 ml se agregan 5 ml de solución estándar de nitrito y es diluido hasta el aforo con agua destilada.

-Reactivo coloreado para la determinación de nitrito. En un matraz de 1000 ml se deben agregar 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 100 ml de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%) y 10 g de sulfanilamida. Tras disolver completamente la sulfanilamida, debe agregarse 1 g de diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina. Todo esto debe ser mezclado para disolver y diluir con agua destilada hasta obtener 1 L de solución. La solución es estable por aproximadamente 1 mes y debe conservarse en un frigorífico, en un frasco oscuro.

#### b) Procedimiento

-Preparación curva de calibración. Para realizar la curva de calibración de nitrito en el espectrofotómetro (540 nm), es necesario diluir la solución patrón antes preparada de nitrito (50 mg/L), para lo cual se preparan diluciones de 0,2 mg/L, 0,4 mg/L, 0,6 mg/L, 0,8 mg/L, 1 mg/L, y diluidas en 100ml de agua destilada.

Tabla 5. Conversión de concentración a volumen

Nitrito (mg/L)	Solución (ml)
0,2	0,4
0,4	0,8
0,6	1,2
0,8	1,6
1	2,0

Una vez preparadas las soluciones estándares, se extrae de cada una de ellas 25 ml, a los que se le adiciona 1 ml del reactivo coloreado. Esta Solución es agitada y en el caso que se produzca la formación de un colorante azo púrpura rojizo producto del acoplamiento de la sulfanilamida diazotada con el diclorhidrato, determinará la medición de nitrito. La medición de nitrito, se puede realizar hasta 1 hora de adicionado el reactivo coloreado, si no es posible obtener resultados con un alto sesgo.

A parte de las soluciones estándares preparadas es necesario realizar una solución blanco, la cual es elaborada a partir de 25 ml de agua destilada, más 1 ml de reactivo coloreado.

-Medición de la muestra. Una vez realizada la curva de calibración para el nitrito, se procede a determinar la cantidad de nitrito presente en cada muestra, para lo cual se deben extraer 0,45  $\mu$ l de muestra extraída de cada cultivo y diluirse a 100 ml. Posteriormente se extraen 25 ml y adiciona 1 ml de reactivo coloreado. Esta mezcla debe ser agitada. Al igual que en la curva de calibración es necesario la elaboración de un blanco. La medición de cada una de las muestras, se debe realizar en duplicado, de tal forma de poder comparar valores obtenidos y ver si realmente existe la oxidación del amonio que contiene el medio de cultivo elaborado.

### 5.7.3. Determinación de Nitrato

La determinación de la concentración de nitrato presente en la muestra se realizo a través del método del electrodo de nitrato, el cual es un sensor selectivo que desarrolla un potencial a través de una membrana delgada, porosa, inerte. El electrodo responde a la actividad del ion  $\text{NO}_3^-$  entre aproximadamente  $10^{-5}$  y  $10^{-1}$  M (0,14 a 1400 mg  $\text{NO}_3^-$  N/L).

a) Reactivos:

-Agua exenta de nitrato. Se debe contar con agua redestilada o destilada, desaionizada, de la máxima pureza para preparar todas las soluciones y disoluciones.

-Solución de Sulfato Amónico Ferroso (ISA). Para la elaboración de ISA es necesario pesar 19,607 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a los cuales se le deben incorporar 20 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y diluirse a 1000 ml.

-Reactivo para determinación de nitrato. Para la elaboración de este reactivo se deben mezclar 0,5 g sulfato de plata, 0,3 g ácido sulfámico y 10 g sulfato de aluminio, posteriormente esta mezcla debe llevarse a pH 4,5.

-Solución madre de nitrato. Solución elaborada en base a nitrato sódico ( $\text{KNO}_3$ ), pero este antes de ser utilizado, debe ser secada en un horno a  $105^\circ\text{C}$  durante 24 h. Una vez realizado este paso, se deben disolver 0,728 g en agua destilada y diluirse a 1000 ml; 1 ml =  $100 \mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{N}$ . Para que esta solución se conserve es necesario agregar 2 ml de  $\text{CHCl}_3/\text{L}$ . Esta solución preparada es estable durante un mínimo de 6 meses.

-Soluciones patrón de Nitrato. Se deberán preparar 4 soluciones patrones de nitrato a distintas concentraciones (1 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L, 1000 mg/L), para lo cual se deben diluir 0,1 ml; 1 ml; 10 ml de solución madre (1000 mg/L) y deben llevarse a 100 ml en un matraz aforado. La cuarta solución patrón a preparar corresponde exactamente a la misma concentración de la solución madre, por lo cual no es necesario diluir, es decir, se utiliza directamente en la curva de calibración.

b) Procedimiento

-Preparación curva de calibración. Para la realización de la curva de calibración se deben agregar 10 ml de la solución estándar preparada (1, 10, 100, 1000 mg/L) a un vaso precipitado de 80 ml y agregar 600  $\mu\text{l}$  de ISA, más 1 ml de reactivo para nitrato. Luego esta mezcla debe ser puesta sobre un agitador magnético y se introduce el electrodo para la determinación de nitrato. Al cabo de aproximadamente 1 minuto se registra la lectura, ya

que en este período es cuando el electrodo ha logrado estabilizarse. La lectura queda expresada en mv. Este procedimiento debe ser repetido con las 4 soluciones patrones. Para una mayor credibilidad de los valores obtenidos, cada medida de los tampones fue realizada en triplicado y finalmente con los datos obtenidos, se elaboró la curva de calibración.

-Medición de la muestra. Una vez realizada la curva de calibración, se procede a determinar la cantidad de nitrato presente en cada muestra, para lo cual se extraen 2,5 ml de muestra, los que posteriormente son vertidos a un vaso precipitado al cual se adiciona agua destilada hasta completar los 10 ml. Se agregan 600 µl de ISA, más 1 ml de reactivo para nitrato. Luego esta mezcla deberá ser puesta sobre un agitador, donde es introducido el electrodo para nitrato. Cada análisis es realizado en duplicados. Obtenidos los valores, se grafican y se analiza la presencia de este, dentro del cultivo.

#### 5.7.4. Medida electrométrica de pH

El crecimiento de las bacterias nitrificantes en cultivo esta determinado por este tipo de variable. Debe encontrarse en un rango apropiado para que de esta forma, su metabolismo funcione adecuadamente, por esta razón resulta fundamental el control del pH durante el tiempo de cultivo.

Para determinar el pH de los cultivos realizados, se desconecta cada cultivo y se mide directamente. Para esto, se utiliza el electrodo de pH, el cual debe ser mantenido aproximadamente 1 minuto dentro del cultivo y de esta forma obtener un valor más acertado de la solución. Entre cada medición de pH, el electrodo debe ser lavado cuidadosamente con agua destilada, a fin de evitar contaminación cruzada a través de este a los cultivos que se están realizando.

En el caso que algunos de los pH medidos se encuentren fuera del rango óptimo de crecimiento para cada grupo de bacterias, será necesario ajustar pH con una base o con un ácido según sea el caso.

#### 5.7.5. Determinación de oxígeno disuelto (OD)

La presencia de OD en los medios de cultivo, permite que estas bacterias se desarrollen en forma óptima, sólo si esta dentro del rango que requieren para su normal crecimiento. El OD determina la oxidación del nitrógeno amoniacal pasando a nitritos y finalmente a nitratos cuyas transformaciones solamente ocurren en medios que contengan bastante OD.

Para medir el OD fue necesario desconectar cada cultivo y se midió directamente. Para lo cual se introdujo la sonda de medición de oxígeno y una vez que el equipo estabilizó (aproximadamente 40 segundos) se registró la concentración de oxígeno, expresada en mg/L.

## 6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante el tiempo de operación de los cultivos se explican en las siguientes secciones.

### 6.1. Determinación de las cinéticas en los cultivos

Las Figuras 4, 5, 6 y 7, ilustran las actividades de las bacterias nitrificadoras y nitrificadoras de los sedimentos, durante el tiempo de operación de los distintos cultivos. En el caso de los cultivos 1 y 2 se calcularon las cinéticas de las velocidades de producción de nitritos (Figura 4 y 5 respectivamente), mientras que en los cultivos 3 y 4, se calcularon las velocidades de consumo de nitritos y producción de nitratos (Figura 6 y 7).

A los distintos consorcios bacterianos nitrificantes, se les suministró sustrato a través de lotes alimentados. En cada cultivo, se realizaron ciclos de alimentaciones sucesivas, 2 para el caso de los cultivos 1 y 2, y 3 en los cultivos 3 y 4, las cuales se realizaron al comienzo de cada ciclo. Al momento de realizar cada alimentación, se controló la concentración de medio fresco que se agregaba a cada cultivo, debido a la existencia de medio remanente que quedaba en cada cultivo. Este procedimiento tenía como finalidad poder mantener los distintos cultivos bajo las mismas condiciones y así, no afectar las respectivas velocidades de crecimiento de los microorganismos y por ende su estado fisiológico.

En la Figura 4 se muestra la evolución de la nitrificación. En este cultivo sólo se midió la generación de nitritos a partir del sustrato alimentado, mostrando en el primer ciclo una baja tasa de producción de  $36 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ , a una velocidad de  $1,7 \text{ mg N/L}\cdot\text{d}$ , debido a que el cultivo se encontraba en la fase lag de su curva crecimiento. La fase lag, corresponde a la etapa de adaptación de los microorganismos a las condiciones del cultivo, tales como: sustrato, pH, etc. Realizada la segunda alimentación, al comienzo del segundo ciclo del cultivo, las bacterias ya se encontraban adaptadas, por lo que no se verificó una etapa lag. Esto se puede comprobar porque existe una mayor concentración de amonio oxidado que fue transformado a nitrito. Se pudo constatar producciones de  $197 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$  con una velocidad de aparición de  $10,7 \text{ mg N/L}\cdot\text{d}$ . Sin embargo, al tiempo de operación de 97 días, se produce una disminución en la producción de nitritos, lo que se explicaría por la baja

cantidad sustrato presente en el medio, razón por lo que la producción entra en un período estacionario y posteriormente decae. Un comportamiento similar se observa para el cultivo 2 (Figura 5), con la diferencia que este cultivo registra una producción máxima de 206 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L a una velocidad de producción de nitrógeno de 12,7 mg N/L·d y además no se verificó una fase estacionaria en el cultivo. Sin embargo, cuando el sustrato se convierte en limitante no se observa producción de nitrito. El consumo de amonio no fue cuantificado, pero se conocía su cantidad inicial al comienzo de cada ciclo, por lo que en ambas figuras (1 y 2) se realizó una curva aproximada o teórica del consumo de éste.

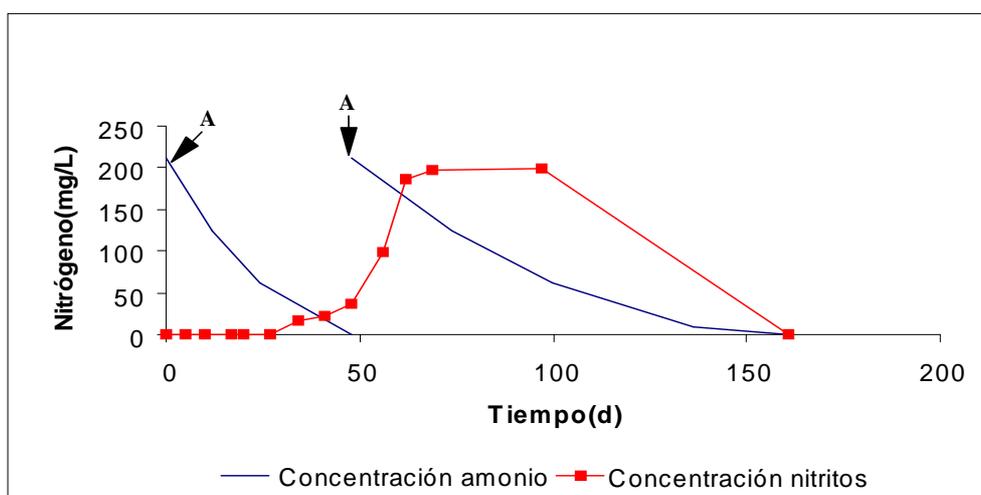


Figura 4. Consumo de amonio y generación de nitritos del cultivo 1.

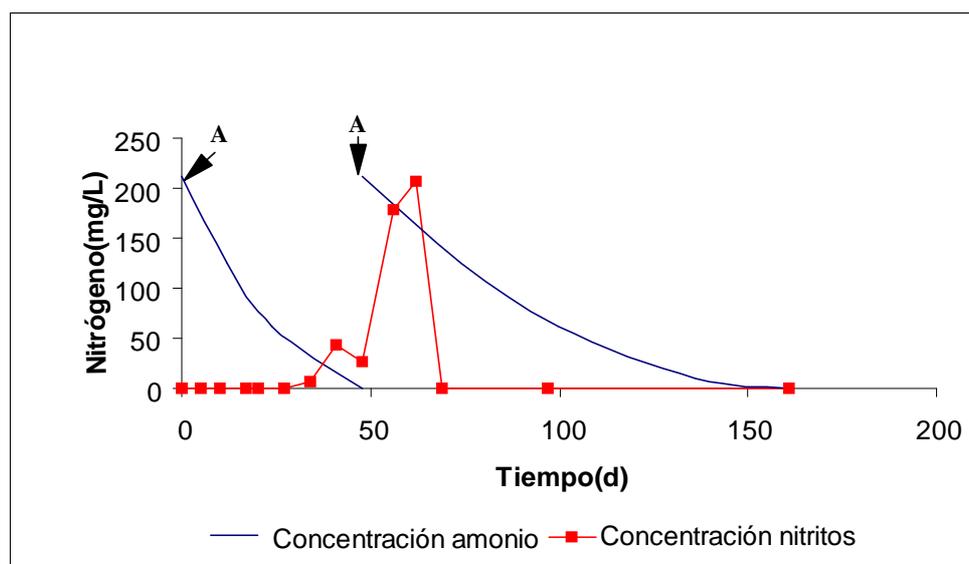


Figura 5. Consumo de amonio y generación de nitritos del cultivo 2.

La etapa de nitratación se observa en los cultivos 3 y 4 (Figuras 6 y 7, respectivamente). En ambos cultivos, a diferencia de los cultivos de amonio oxidante, no se observa una fase de lag, por lo que una vez inoculados los cultivos y suministrado el sustrato, se inicia el consumo de nitritos y generación de nitratos. Pese al consumo de nitritos que se observa, no se produce una gran producción de nitratos, sino que la producción toma valores constantes a lo largo del desarrollo de cada cultivo. El cultivo 3, presenta sus mayores velocidades de producción de nitratos en el primer ciclo, siendo ésta de 34 mg N/L·d, las que tienden a disminuir durante el transcurso del cultivo. Lo mismo se explica para el cultivo 4 cuya velocidad en el primer ciclo es de 19,3 mg N/L·d, lo cual no se explica debido a las velocidades de consumo de sustrato obtenidas, las cuales a lo largo de cada cultivo tienden a tomar valores más altos. Las mayores producciones de nitratos se obtienen en el cultivo 4 con valores de 631 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, obtenidos durante el desarrollo del segundo ciclo, a una velocidad de 1,2 mg N/L·d, posterior a esto, la producción tiende a disminuir, hasta el momento que se realiza la ultima alimentación. En el cultivo 3 se aprecia una producción máxima de 404 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L durante el desarrollo del tercer ciclo, a una velocidad de 4,2 mg N/L·d.

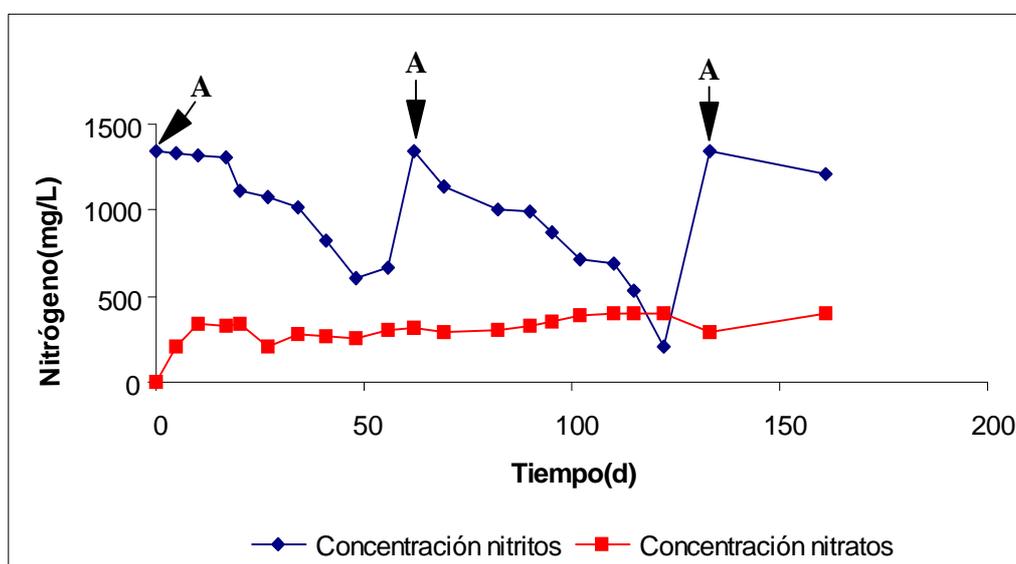


Figura 6. Consumo de nitrito y generación de nitratos del cultivo 3.

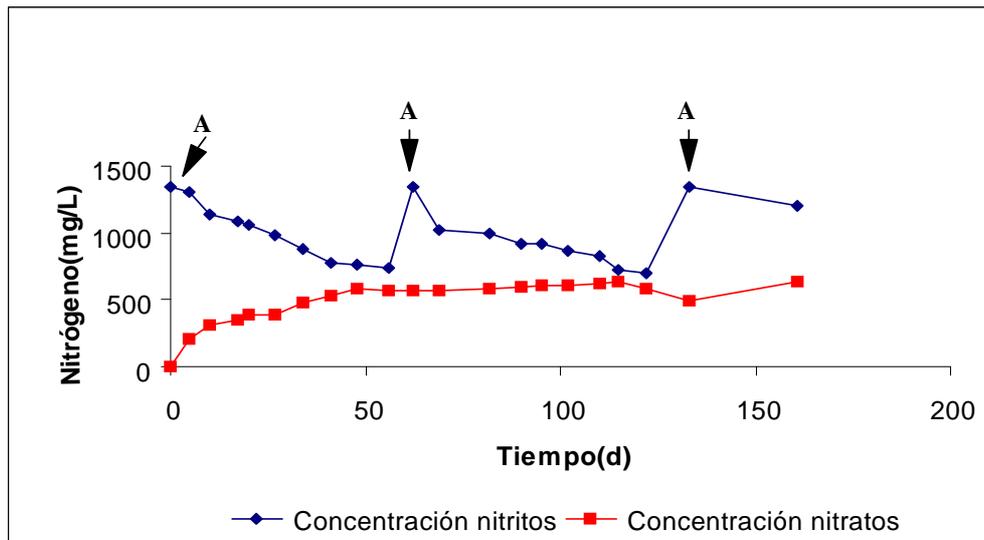


Figura 7. Consumo de nitrito y generación de nitratos del cultivo 4.

En la Tabla 6 se muestra la operación de los distintos cultivos, considerando la velocidad máxima de consumo de sustrato o bien, la velocidad máxima de aparición de productos ( $\text{N-NO}_2^-$  ó  $\text{N-NO}_3^-$ ).

Tabla 6. Caracterización del desarrollo del cultivo

Cultivo	Etapa lag (d)			Ciclos (d)			Velocidad máx. de consumo (mg/L·d)			Velocidad máx. de producción (mg/L·d)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	27	0	-	48	113	-	*	*	-	2	10	-
2	27	0	-	48	113	-	*	*	-	3	13	-
3	0	0	0	62	71	28	-22,5	-18,9	-4,2	34	1,4	4,2
4	0	0	0	62	71	28	-14,8	-10,7	-4,6	12,2	1,2	4,9

\* Velocidad de consumo de amonio no calculada

## **6.2 Determinación de biomasa**

### **6.2.1. Sólidos suspendidos volátiles (SSV)**

Se pudo determinar los SSV presentes en los cultivos de nitrificantes. Los cultivos de nitrificadoras presentaron un mayor número de biomasa con valores de 47,9 g SSV/L, mientras que para el caso de cultivos de bacterias nitrificadores, este valor fue inferior, con correspondiendo a 4.6 g SSV/L.

### **6.2.2. Recuento de colonias**

Por medio del recuento de colonias de bacterias, se determinó el número de colonias/ml de cada cultivo. Este método es utilizado para bacterias heterotróficas, pero mediante la utilización de medio selectivo (Tabla 2 y 3 antes mencionadas), fue posible implementarlo para bacterias nitrificantes. El primer recuento se realizó el día de operación 70, el cual fue realizado en medio de agar, lo cual permitió el crecimiento tanto de bacterias heterótrofas como autótrofas, lo que indicaría que en estos cultivos no sólo existían bacterias nitrificantes sino que también heterótrofas.

Los siguientes 2 recuentos, se realizaron utilizando un medio para bacterias nitrificantes siendo posible sólo observar el desarrollo de éstas. En el recuento con medio selectivo en el día operación 151, el cultivo 1, obtiene valores bajos de colonias si se comparan con los obtenidos en el tercer recuento. Mientras que en el cultivo 2, el número de colonias aumenta pero no en grandes cantidades.

Para el caso de los recuentos de bacterias nitrificadoras, se observan disminuciones en el número de colonias, lo cual se podría explicar por el lento crecimiento que presentan, ya que a pesar de haber transcurrido un tiempo de incubación, el número de colonias es bajo. Esto se debe a que las colonias crecen en forma difusa y su crecimiento resulta complejo debido al color del medio de cultivo utilizado (inoloro). Sin embargo, en el caso de bacterias nitrificadoras el compuesto de rojo fenol ayuda a una mejor identificación de las colonias.

Tabla 7. Recuento en placas

Día operación	Cultivo	Recuento(UFC/ml)
70	1	1490
	2	1500
	3	960
	4	1115
151	1	990
	2	2060
	3	4095
	4	3470
216	1	3140
	2	2500
	3	3240
	4	2080

### 6.3. Actividad nitrificante

En la respirometría realizada para bacterias nitritadoras, se observa que los mayores consumos de oxígeno se registraron a la concentración más baja (50 mg N/L), correspondiendo a 1,09 mg O<sub>2</sub>/L.

A medida que aumenta la concentración del sustrato suministrado, la capacidad de las bacterias para oxidar estos compuestos va disminuyendo. Lo mismo se explica para las respirometrías realizada a bacterias nitradoras, con la diferencia que estas, presentan porcentajes de consumo de oxígeno inferiores, siendo estos de 0,32 mg O<sub>2</sub>/L (Tabla 8 y 9 respectivamente).

Tabla 8. Valores de respirometría para bacterias nitritadoras

	B1	50 mg N/L	100 mg N/L	150 mg N/L	250 mg N/L	B2	500 mg N/L
% O <sub>2</sub> /L	3,5	13,0	12,6	7,5	6,9	7,9	7,9
mg O <sub>2</sub> /L	0,31	1,09	1,05	0,63	0,57	0,66	0,66

B1, corresponde al blanco utilizado para las concentraciones de (50, 100, 150, 250 mg N/L). B2, blanco utilizado para concentración de 500 mg N/L.

Tabla 9. Valores de respirometría para bacterias nitradoras

	B1	50 mgN/L	100 mgN/L	150 mgN/L	B2	250 mgN/L	500 mg N/L
% O <sub>2</sub> /L	2,4	3,8	3,0	2,9	8,9	9,1	9,0
mg O <sub>2</sub> /L	0,20	0,32	0,25	0,24	0,75	0,77	0,75

B1, corresponde al blanco utilizado para las concentraciones de (50, 100, 150 mg N/L). B2, blanco utilizado para las concentraciones de 250 mg N/L y 500 mg N/L.

Además mediante estos ensayos, fue posible determinar las velocidades de consumo de oxígeno (VCO) de la biomasa presente en los cultivos, tanto para el caso de bacterias nitritadoras como también bacterias nitradoras a las distintas concentraciones, las cuales se muestran en la Tabla 10. Las máximas VCO, para bacterias nitritadoras, se registran a la concentración de 50 mg N/L con valores de 0,08 mg O<sub>2</sub>/L min, lo mismo se explica para los cultivos realizados con bacterias nitradoras, con la diferencia que estas presentan valores bajos de VCO, correspondiendo a 0,031 mg O<sub>2</sub>/L min. A medida que aumenta la

concentración de los sustratos, las bacterias van disminuyendo sus velocidades de oxidación.

Tabla 10. Velocidades de consumo de oxígeno de cultivos de bacterias nitritadoras y bacterias nitradoras

mg N/L	VCO (mg O <sub>2</sub> /L·min) Bacterias nitritadoras	Bacterias nitradoras
B1	0,0491 ± 0,0007	0,0197 ± 0,0020
B2	0,0259 ± 0,0027	0,0634 ± 0,0014
50	0,0818 ± 0,0035	0,0319 ± 0,0016
100	0,0783 ± 0,0023	0,0253 ± 0,0020
150	0,0476 ± 0,0018	0,0234 ± 0,0005
250	0,0436 ± 0,0012	0,0672 ± 0,0018
500	0,0500 ± 0,0011	0,0667 ± 0,0015

B1 y B2, blancos utilizado para las distintas concentraciones.

B1 (50, 100, 150, 250 mg N/L) y B2 (500 mg N/L), para nitritadoras.

B-1 (50, 100, 150 mg N/L), B2 (250 mg N/L y 500 mg N/L), para el caso de bacterias nitradoras.

También es posible calcular las respectivas VCO considerando los factores estequiométricos, en función del amonio, para bacterias nitritadoras y, en función del nitrito, para bacterias nitradoras. Dichas velocidades se obtienen, a través del cociente entre las VCO previamente calculadas y un factor estequiométrico específico para cada etapa de la nitrificación, siendo este de 3,43 g O<sub>2</sub>/g N, para el caso de bacterias nitritadoras, y de 1,14 g O<sub>2</sub>/g N, para bacterias nitradoras. Las velocidades obtenidas finalmente fueron de 0,023 mg N/L·min y de 0,027 mg N/L·min, para el caso de nitritadoras y nitradoras, respectivamente.

Por medio de la VCO cuantificada para cada sustrato, se determinó el consumo neto de oxígeno (CNO), a partir de las diferencias entre las VCO entre los distintos ensayos

respirométricos. La Figura 8, muestra para ambos tipos de bacterias nitrificantes los máximos de CON. En ambos casos se registraron para la concentración de 50 mg N/L, correspondiendo a 0,055 mg O<sub>2</sub>/L·min, para bacterias nitritadoras y 0,0122 mg O<sub>2</sub>/L·min para bacterias nitradoras. Estos valores obtenidos, coinciden con los obtenidos a lo largo de las distintas respirometrías, ya que las máximas actividades de la biomasa nitrificante, se registraron a la concentración más baja del sustrato suministrado. Posterior a esta concentración, las actividades comienzan a disminuir. Las bacterias nitritadoras presentan un mayor CON, comparado con las bacterias nitradoras.

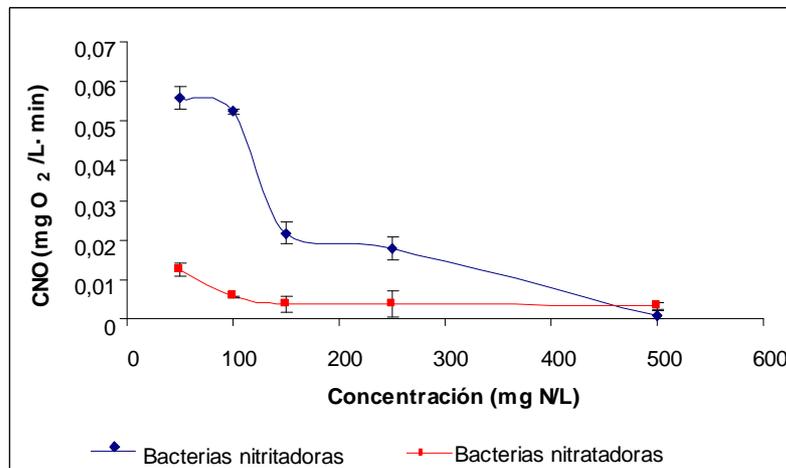


Figura 8. Relación consumo neto de oxígeno entre ambos grupos de bacterias nitrificantes.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Aislamiento de bacterias nitrificantes

Winogradsky hacia 1980, aisló a los microorganismos responsables del proceso de nitrificación. Dentro de este grupo de bacterias las especies más representativas son *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradsky*, los otros géneros bacterianos aparecen en general en bajos números y además presentan rangos de temperatura y pH más estrechos para su desarrollo.

Al igual que lo señalado por Sánchez (1999), al comienzo de los cultivos implementados en este estudio, se generaron una serie de inconvenientes, debido a que los inóculos utilizados, no sólo contenían bacterias del tipo nitrificante, sino que también heterótrofas, las cuales comenzaron a utilizar los componentes orgánicos excretados por las bacterias nitrificantes, sirviéndoles de alimento. Al desarrollarse ambos tipos de bacterias en los cultivos, las bacterias heterotróficas pueden superar y eclipsar el crecimiento de las bacterias nitrificante, esto por la alta tasa de crecimiento que poseen. Por esta razón, los cultivos a lo largo de los experimentos, fueron enriquecidos selectivamente, en lo que respecta a las condiciones nutritivas y fisiológicas que estos microorganismos requieren.

Una vez iniciado los cultivos, se controlaron diversos factores en el medio, ya que cualquier fluctuación drástica, inhibe el crecimiento adecuado de las colonias bacterianas, dentro de los cuales se mencionan, la concentración de sustrato, temperatura, pH, tensión del oxígeno, grado de exposición a la luz y esterilidad del medio.

Los cultivos presentaron fluctuaciones de pH, entre el intervalo de 6,5- 8,5, razón por la cual era necesario realizar correcciones de este parámetro, ya que según estudios realizados previamente, se determinó que para la obtención de cultivos puros de los géneros de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, se requiere un rango óptimo de pH, entre el intervalo de 7,2- 9,0 (Sharma *et al.*, 1977; Loveless *et al.*, 1968), por lo cual se utilizó NaOH para aumentar la basicidad del medio ó HCl si se necesitaba disminuir el pH, ya que lo ideal era que cada cultivo se encontrara a pH 7,5. Estas correcciones de pH son producto del efecto del CO<sub>2</sub> sobre los cultivos, ya que existe un equilibrio entre el ácido carbónico y el bicarbonato. Al

producirse alteraciones del equilibrio, se inducen variaciones en el rango de pH. A pH 7, los rangos de nitrificación disminuyen casi al 50% y a más del 90% cuando el pH es 6,5. Cuando baja a pH 6, la nitrificación es completamente inhibida en las reacciones de síntesis y energéticas (Huesemann *et al.*, 1998).

Billen (1976) determinó que para oxidar 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NH}_4$  se requieren 0,1  $\mu\text{mol}$  de bicarbonato y para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2$ , es necesario 0,02  $\mu\text{mol}$  de bicarbonato. Propuso que la nitrificación puede estimarse indirectamente por la cantidad de bicarbonato utilizado.

Belser (1984) realizó cultivos en los que determinó que se requieren  $0,0863 \pm 0,0055$   $\mu\text{mol}$  de bicarbonato por  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NH}_4$  oxidado para el caso de *Nitrosomonas*, mientras que para *Nitrobacter* se requieren  $0,0236 \pm 0,0013$   $\mu\text{mol}$  de bicarbonato por  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2$  oxidado.

Se ha determinado que el intervalo de temperatura a la cual obtienen su máximo desarrollo se encuentra entre 25-35°C, ya que viven en un rango mesófilo. Por esta razón los cultivos se mantuvieron a 25°C. Según Winogradsky (1980), cuando el medio baja a 18°C su crecimiento se reduce al 50%, mientras que si baja a 8°C su crecimiento baja al 70% y a 4°C simplemente no hay actividad. Sin embargo, se han encontrados en ambientes naturales que no presentan estas condiciones, por lo que se han realizados pruebas experimentales, tratando de igualar dichas condiciones (ambientes con bajo pH, bajos niveles de oxígeno, temperatura), pero no crecen, sino más bien se mantienen.

No se realizaron mediciones de salinidad en los cultivos, ya que estudios previos demostraron que estos microorganismos no se inhiben por cambios drásticos de salinidad, ajustándose normalmente en un periodo no superior a 3 días (Komori *et al.*, 1995).

Hendrikus *et al.* (1993) determinó que *Nitrosomonas europaea* posee una afinidad mucho mayor por el oxígeno que *Nitrobacter winogradsky*, debido a este hecho, cuando se establece competencia en condiciones en las que el oxígeno resulta limitante, es posible observar acumulaciones de nitritos y no de amonio.

Una vez controladas las variables ambientales del medio de cultivo las microcolonias pueden ser visibles al microscopio después de una semana, pero las colonias visibles al ojo humano toman de 1 a 4 meses de incubación. La oxidación del amonio se detecta por incremento en la concentración de  $\text{NO}_2^-$  ó  $\text{NO}_3^-$  en los cultivos, lo cual suele observarse después de 6 - 8 semanas de iniciado el cultivo, lo cual fue corroborado en estos cultivos.

Por lo antes descrito, el aislamiento de bacterias nitrificantes resulta difícil, debido al cuidado que requieren estos cultivos y es comúnmente frecuente, encontrar en el medio contaminantes como *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*. Su crecimiento lento, dificulta la eliminación de estos contaminantes.-----

## **7.2. Actividad nitrificante**

Si se compara la velocidad de crecimiento de bacterias nitrificantes con bacterias heterótrofas, esta es baja. Se han registrado tiempos de duplicación de 8 h en medios de cultivos para bacterias nitrificantes. En la naturaleza se piensa que este tiempo sobrepasa las 20 – 24 h.-

Otros estudios señalan que los tiempos de duplicación para bacterias nitrificadoras se encuentran entre 7-20 h, las cuales además presentan un bajo rendimiento celular 3-10%, con un  $\Delta G^\circ$  278 kJ/mol. En el caso de las nitrificadoras, presentan características similares, salvo que la energía libre es tres veces menor que la obtenida en la etapa de nitrificación, presentando un  $\Delta G^\circ$  73 kJ/mol y con un tiempo de duplicación más amplio entre 10-140 h (Baas-Becking & Parks, 1927; Skinner & Walter, 1961; Belser & Schmidt, 1980).

Además a sido posible determinar que las bacterias nitrificantes, presentan un bajo rendimiento celular, por cada kg N- $\text{NH}_4^+$  oxidado las bacterias nitrificadoras producen 0,15 kg de biomasa , mientras que las bacterias nitrificadoras, por cada kg N- $\text{NO}_2^-$  oxidado, generan 0,02 kg de biomasa, presentando un bajo rendimiento celular.

En cultivos nitrificantes discontinuos, el sustrato energético puede ser un factor limitante, en este caso amonio o nitrito. *Nitrosomonas* generalmente oxida 35 unidades de nitrógeno y *Nitrobacter* unas 100 unidades de nitrógeno por cada C-CO<sub>2</sub> asimilado.—

Less & Simpson (1956), determinaron la actividad de bacterias nitrificantes, transcurrido 3 semanas de experimentos, y mostraron la inhabilidad de estas bacterias nitrificadoras para oxidar más de 1,4 mg N-NO<sub>2</sub>/ml. Cada cultivo implementado en este estudio fue de 10 L. La baja velocidad de oxidación de amonio de las bacterias, lo atribuyeron a la acumulación de metabolitos finales en el medio de cultivo. Al igual que los cultivos implementados en este estudio, los cultivos de Less & Simpson (1956) tampoco lograron ser puros, ya que algunos se encontraban contaminados con organismos heterótrofos. Lo cual podría explicar las bajas actividades registradas en los cultivos.

**Sánchez (1996)**, realizó análisis de respirometría en efluentes con alta carga orgánica, a través de la cual determinó las constantes biocinéticas, y además las actividades de las bacterias nitrificantes. En esos estudios se determinó que el consumo de oxígeno esta directamente relacionado con el crecimiento de la biomasa y con el consumo de sustrato. Relación que no fue posible observar en este estudio, ya que, para el caso de los cultivos utilizados en esta experiencia, la mayor biomasa fue registrada en los cultivos de nitrificadoras con valores de 47,9 g SSV/L, cultivos que no presentaron las mayores VCO, por el contrario éstas VCO fueron inferiores a las registradas por bacterias nitrificadoras. Lo cual se podría explicar por el comportamiento de éstas, de hecho la producción de nitrato fue constante durante el desarrollo de los cultivos. Más aún, apenas iniciado los sistemas batch se registraron consumos de nitrito y producción de nitratos en forma inmediata y estos valores se mantuvieron durante los 3 ciclos, sin mayores fluctuaciones. Quizás gran parte de esta biomasa, se podría encontrar inactiva, debido a que en los sistemas discontinuos podría producirse alguna acumulación de compuestos específicos, por las alimentaciones sucesivas.

## 8. CONCLUSIÓN

- Por medio de este trabajo se logró obtener cultivos enriquecidos y evaluar la actividad nitrificante de bacterias proveniente de un centro de cultivos de salmones.

- A través de mediciones de nitritos y nitratos, se pudo determinar las respectivas velocidades de consumo de sustrato y generación de productos, por parte de bacterias nitrificantes. Los bajos valores de nitritos y nitratos, como también los valores de biomasa en el tiempo, corroborarían la baja tasa de crecimiento que presentan las bacterias nitrificantes.

- Los ensayos respirométricos, resultaron ser una herramienta eficaz para la determinación del consumo de oxígeno y por ende la actividad nitrificante presente en los sedimentos. Se pudo determinar que la velocidad de consumo de oxígeno, respecto del factor estequiométrico fue de 0,023 mg N/L·min y de 0,027 mg N/L·min, para el caso de nitritadoras y nitradoras, respectivamente.

- Aunque los cultivos se realizaron bajo condiciones óptimas de laboratorio, las bacterias nitrificantes presentes en estos sedimentos, no fueron capaces de oxidar eficientemente las concentraciones de amonio y nitrito suministradas. De este modo, los consorcios bacterianos de los distintos cultivos presentaron bajas velocidades de crecimiento y por ende, se detectaron producciones de nitritos de 197 – 206 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L para el caso de bacterias nitritadoras, mientras que para las nitradoras producciones de 404 - 631 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Debido a lo antes indicado, se podría concluir que los sedimentos del fondo marino son incapaces de oxidar la gran cantidad de compuestos nitrogenados generados por esta actividad acuícola.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Anthonisen, A., Loehr, R., Prakasam, T. & Srinath, E. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.* 48:835-852.
- Austin, B. 1990. *Methods in aquatic bacteriology*. Second edition. 425 pp.
- Baas-Becking, L. & Parks, G. 1927. Energy relations in the metabolism of autotrophic bacteria. *Physiol. Rev.* 7: 85.
- Balmelle, B., Nguyen, K., Capdeville, J. & Deguin, A. 1992. Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. *Wat. Sci. Tech.* 26(5-6):1017-1025.
- Bastén, J. & Clement, A. 1999. Oceanografía del estuario de Reloncavi, X Región de Chile. *Ciencia y Tecnología del Mar*, 22:31-46.
- Bergey's. *Manual of systematic Bacteriology*. 1989. Ed. James T. Stanley, Marvin P. Bryant, Norbet Pfenning, John G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Belser, L. W. 1984. Bicarbonate uptake by nitrifiers. *Appl. Environ. Microb.* 48:1100-1104.
- Belser, L. & Schmidt, E. 1980. Growth and oxidation of ammonia by three genera of ammonium oxidizers. *Fens Microbiol. Lett.* 7:213-216.
- Beveridge, M.C.M 1996. *Cage Aquaculture*. Second Edition. Fishing News Book. Oxford, 346pp.
- Brion, N & Billen, G. 1998. A reassessment of the HCO<sub>3</sub> incorporation method for measuring autotrophic nitrification and its use to estimate the biomass of nitrifying bacteria. *Rev. Sci. Eau* .11(2):283-302.
- Buschmann, A., López, D. & Medina, A. 1996. A review of the environmental effects and alternative production strategies of marine Aquaculture in Chile. *Aquacult Eng.* 15:397-421.
- Buschmann, A. 2001. *Impacto ambiental de la acuicultura*. El estado de la investigación en Chile y el mundo. Terram publicaciones, Santiago, 63 pp.
- Campbell, A., Hellebust, J. & Watson, S. 1966. Reductive pentose phosphate cycle in *Nitrosocystis oceanus*. *J. Bacteriol.* 91:1178-1185.
- Capone, D. 2000. "The marine microbial nitrogen cycle". *Microbial Ecology of the oceans*. Editor Wiley-Liss, New York. 455-488.

- Claude, M. & Oporto, J. 2000. La ineficiencia de la salmonicultura en Chile. Terram publicaciones, Santiago, 68pp.
- Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J. & Gómez, J. 2000. Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42:73-82.
- Hofman, T. & Less, H. 1951. The biochemistry of the nitrifying organisms. *Biochem. J* 52:140-142.
- Huesemann, M., Skillman, A. & Crecelius, E. 1998. The effects of CO<sub>2</sub> disposal on marine nitrification processes. *Arch. Microbiol.* 38:250-265.
- Knowles, R. 1982. Denitrificación. *Microbiol. Rev.* 46:43-70.
- Less, H. & Simpson, R. 1951. The biochemistry of the nitrifying organisms. *Biochem. J* 65:297-305.
- Loveless, J. & Painter, H. 1968. The influence of metal ion concentration and pH value on the growth of *Nitrosomonas* stain isolated from activated sludge. *J. Gen. Microbiol.* 52:1-14.
- Pantoja, S., Rossel, P. & Contreras, S. 2004. Ciclos biogeoquímicos & Werlinger, C. Biología marina y oceanografía: conceptos y procesos. Consejo nacional del libro y la lectura- Universidad de Concepción. Trama impresores S. A., Chile.700pp.
- Pizarro, R. 2006. Taller científico “Investigación ambiental de la salmonicultura Chilena”. [www.wwf.cl](http://www.wwf.cl).
- Salamanca, M. 2006. Taller científico “Investigación ambiental de la salmonicultura Chilena”. [www.wwf.cl](http://www.wwf.cl).
- Soto, D. 2002. Oligotrophic patterns in southern Chilean lakes: the relevance of nutrient and mixing depth. *Rev. chil. hist. nat.* 75:377-393.
- Suschka, J. & Ferreira, E. 1986. Activated sludge respirometric measurements. *Wat. Res.* 20: 137-144.
- Rittenberg, S. 1969. The roles of exogenous organic matter in physiology of chemolithotrophic bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 3:159-196.
- Sharma, B. & Ahlert, R. 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Wat. Res.* 11:897-925.
- Skinner, F. & Walter, N. 1961. Kinetics studies of *Nitrosomonas* in batch and continuous culture. *Arch. Microbiol.* 38:339-349.

- Troell, M., Halling, C., Nilsson, A., Buschmann, A., Kautsky, N & Kautsky, L. 1997. Integrated marine cultivation of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output. *Aquaculture*, 156:45-61.
- Winogradsky, S. 1980. Contributions á la morphologie des organismes de la nitrification. *Arch. Sci* 1:86-137.