

CARACTERIZACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA Y METABOLISMO DE LAS BACTERIAS CULTIVABLES EN EL RESERVORIO ARTIFICIAL DEL COLEGIO ROCHESTER

Luis Carlos Pardo¹, Sofía Palomino Linares¹, Alejandro Torres Rico¹,
Erika Díaz Sana² y María del Pilar Tunarroza³

Estudiantes Colegio Rochester¹, Asistente de Laboratorio², Directora de Ciencias³

Abstract

Small reservoirs are prevalent landscape features that affect the physical, chemical, and biological characteristics of headwater streams and land around them. We reported a four months characterization of the artificial reservoir of Rochester School in Chia, Colombia. The site was sampled weekly for water quality parameters (pH, dissolved oxygen, turbidity, alkalinity, total phosphates, total nitrate with the use of protocols proposed by GLOBE and the analysis kit for water La Motte). The most fluctuated parameters were the concentration of nitrates and dissolved oxygen. Procedures for cultivating and characterizing bacteria and their metabolism were made, finding 23 isolates with both fermentative and oxidative metabolic capacities, low motility and great capacity to reduce nitrates, possibly as an adaptive measure to changes in chemical conditions of water and nutrient availability. All of this in order to first know the properties of the sample site and in a future evaluate whether or not it was possible to have complex animals.

Resumen

Los reservorios son cuerpos de agua característicos del paisaje, que influyen en las características físicas, químicas y biológicas de las corrientes de agua y la tierra que las rodea. Con este escrito, reportamos una caracterización de cuatro meses del reservorio artificial del Colegio Rochester en Chía, Colombia. Se realizó un muestreo semanal para medir los parámetros de calidad del agua (pH, oxígeno disuelto, turbidez, alcalinidad, fosfatos totales, nitrato total con el uso de protocolos propuestos por GLOBE y el kit de análisis para agua de La Motte). Los parámetros la concentración de nitratos y oxígeno disuelto fueron los parámetros que mostraron mayor fluctuación a lo largo del tiempo. Se realizaron procedimientos para cultivar y caracterizar el metabolismo bacteriano, encontrando 23 aislamientos con capacidades metabólicas fermentativas y oxidativas, baja motilidad y gran capacidad para reducir los nitratos, posiblemente como una medida de adaptación a los cambios en las condiciones químicas del agua y la disponibilidad de nutrientes. Todo esto con el fin de conocer primero las propiedades del sitio de muestra y, en un futuro, evaluar si era posible la supervivencia de animales complejos en nuestro reservorio.

Objetivo general

Correlacionar las variaciones en los parámetros fisicoquímicos del agua en presencia de bacterias cultivables que se encuentran en el reservorio del colegio.

Objetivos específicos:

- Evaluar los parámetros fisicoquímicos tales como: pH, concentración de fosfatos, nitratos, oxígeno disuelto, alcalinidad y turbidez mediante el uso del kit de *La Motte* y recomendaciones del programa GLOBE.
- Aislar las bacterias cultivables presentes en el reservorio mediante siembra por agotamiento.
- Caracterizar la morfología y metabolismo de las bacterias aisladas mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

Introducción

Nuestro objetivo fue caracterizar los parámetros fisicoquímicos y el metabolismo de los microorganismos que viven en el cuerpo de agua para guiar futuros estudios a la evaluación de la posibilidad de tener organismos superiores, ya sean plantas o peces, que vivan allí. Las propiedades analizadas fueron las siguientes: **Alcalinidad**, definida como la capacidad amortiguadora del agua o de recibir protones y resistirse a los cambios de el **pH (concentración de hidrogeniones)** que podrían hacer que el agua sea más ácida y afectar a los organismos que la habitan. En los cuerpos de agua factores como el tipo de suelo y las partículas disueltas ya sean hidrogeniones y/o sales afectan tanto el pH como la conductividad, estos factores lo podemos estimar a través de la medición de la **turbidez**, la cual es una medida indirecta de los sólidos en suspensión. **Oxígeno disuelto**, es uno de los parámetros más importante para la determinación de la calidad del agua, ya que es crucial para la supervivencia de los organismos aeróbicos y la fauna acuática en los cuerpos de agua, también indica si existe algún tipo de contaminación, determina el tipo de **microorganismos** y metabolismo de los mismos (aeróbico o anaeróbico), al conocer la concentración de oxígeno también podemos predecir el tipo de proceso biológico aeróbico que puede tener lugar para transformar los contaminantes orgánicos biodegradables descargados en el agua (Ibáñez, J. G, et al. 2008). **Fosfatos**: el fósforo es uno de los elementos requeridos por las plantas en cantidades relativamente grandes, son esenciales debido a la alta energía que aporta a las células por medio de fosfatos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y varias coenzimas esenciales. **Los nitratos**, que son una forma inorgánica de nitrógeno que juegan un papel importante en un ecosistema ya que sus propiedades sirven como nutrientes para las plantas, microorganismos y otros seres vivos que se pueden encontrar en el agua. El desarrollo de estos estudios es muy importante ya que creemos que contribuyen al desarrollo sostenible preservando una alta biodiversidad en flora y fauna silvestre (incluso especies migratorias), ofreciendo protección contra la erosión, mitigando las inundaciones, favoreciendo la recarga de agua subterránea, la purificación del agua y estabilizando la temperatura local y las condiciones de lluvia (Pérez-Castillo, et al. 2008). Teniendo en cuenta que nuestra escuela promueve la conservación de la biodiversidad nativa, podemos decir que también es de extrema importancia en nuestro contexto escolar. Una vez que la investigación y el análisis han sido finalizados, nuestro objetivo es poder res-

ponder en investigaciones futuras a qué tipo de organismos son ideales para vivir en el lugar experimentado y por qué. Más adelante, contribuir a la expansión de la vida silvestre de esta región y la modificación de los parámetros para que los haya disponibles para su uso.

Metodología

La siguiente Figura 1, muestra la ubicación de nuestra escuela donde medimos los parámetros fisicoquímicos, está ubicada en las afueras de Bogotá, cerca del municipio de Chía con coordenadas: Latitud 4.82, Longitud -74 con una elevación de 2612 m. En este ambiente es común un clima frío con variaciones como el aumento de la temperatura en el mediodía.

Figura 1. Vista espacial de la Escuela Rochester, a) En el círculo se muestra la ubicación del depósito en la Escuela Rochester



Para llevar a cabo la medición siempre tuvimos en mente nuestros objetivos de medir tanto los parámetros físicos como los químicos, que a su vez nos servirán más adelante para comprender cómo influyeron sobre los organismos en el medio ambiente.

Se realizaron mediciones semanales de los parámetros fisicoquímicos tales como: Concentración de hidrogeniones (pH), Concentración en partes por millón (ppm) de nitratos, fosfatos, alcalinidad oxígeno disuelto (OD), conductividad eléctrica y turbidez con disco Secchi. Esto según el protocolo propuesto por el *Kit Water Quality Monitoring La Motte* código 5870 y el tiempo recomendado por *The Globe Program*. Se realizaron titulaciones tanto para la medición de oxígeno disuelto como para la alcalinidad. Para medir OD se utilizó el método modificado de Win-

kler y para alcalinidad se realizaron titulación mediante lecturas del viraje de fenolftaleína (P) y alcalinidad total (T) en términos de carbonato de calcio CaCO_3 . Los rangos de detección de las titulaciones que se tuvieron en cuenta fueron de 0,2 - 10,0 ppm (intervalos de 0,2 ppm) y de 0.0 - 200 ppm respectivamente. También se realizaron *Tests* colorimétricos para las mediciones de pH, nitratos y fosfatos. para pH se tuvo en cuenta un rango entre 3 - 10; la concentración de nitratos se analizó por el método modificado A.P.H.A.; y finalmente se determinó la concentración de fosfatos a partir de las diferentes tonalidades de azul generadas por el ácido ascórbico en reacción con las diferentes concentraciones de fosfatos presentes en la muestra, tanto para nitratos como para fosfatos se manejaron rangos entre 0,2 ppm - 1.0ppm (Figura 2).

Figura 2. Toma de Muestras y Análisis de parámetros Físicoquímicos



Las mediciones descritas anteriormente con su entrada de datos en las Figuras 3. son aspectos importantes para determinar y comprender el tipo de microorganismos y organismos en general que viven o pueden vivir en este entorno, en nuestro caso se centra específicamente en microorganismos ya que estos sirven como una medida integral para entender que sustancias o elementos pueden conducir a la expansión de estos. El análisis microbiológico se realizó teniendo en cuenta las características morfológicas macro y micro como se muestra en la Figura 4.

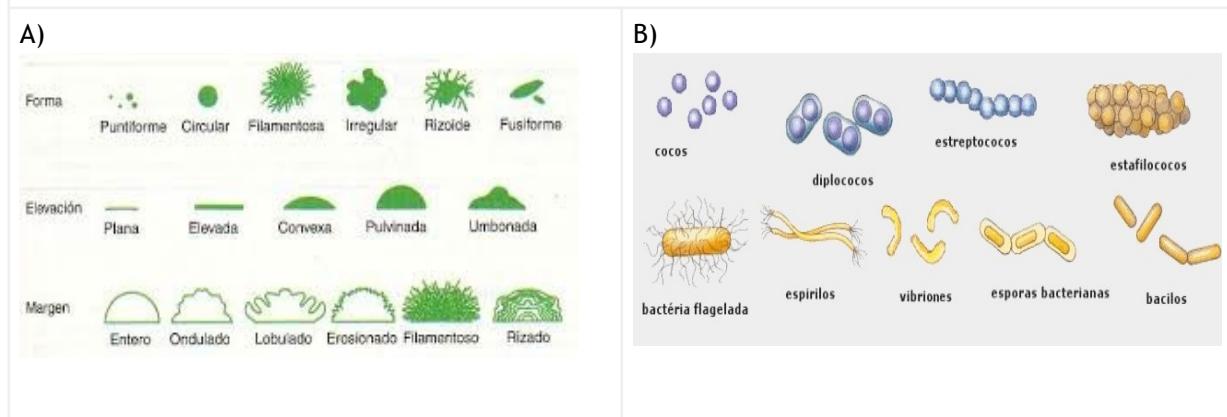
Para analizar los microorganismos cultivables presentes en el reservorio se tomó una muestra de suelo y se dejó secar a temperatura ambiente, se tomaron 10 gramos de este suelo y se re-suspendieron en 90 ml de agua de peptona estéril al 0,1%. De la resuspensión se realizaron diluciones en serie de 1 ml de resuspensión en 9 ml de agua de peptona hasta una dilución de 1×10^{-21} y finalmente, se tomaron 100 ul de las últimas cinco diluciones en una caja de Petri con agar de conteo en placa (APC), se incubaron a 37°C durante 8 días.

Pasados los 8 días se tomaron las diferentes colonias bacterianas crecidas y se sembraron por agotamiento hasta observar colonias puras, obteniendo un total de 23 cepas, a cada una se le realizó la tinción de Gram para identificar su morfología microscópica y se observaron con el estereoscopio para determinar la morfología de la colonia (Figure 3 and 5) (Zapata, H. A. V. 2004).

Figura 3. A) Menú de ingreso de datos de GLOBE y B) Ejemplo de ingreso de datos de PH



Figura 4. A) Morfología macroscópica de las colonias y B) Morfología de las bacterias



Resultados y Discusión

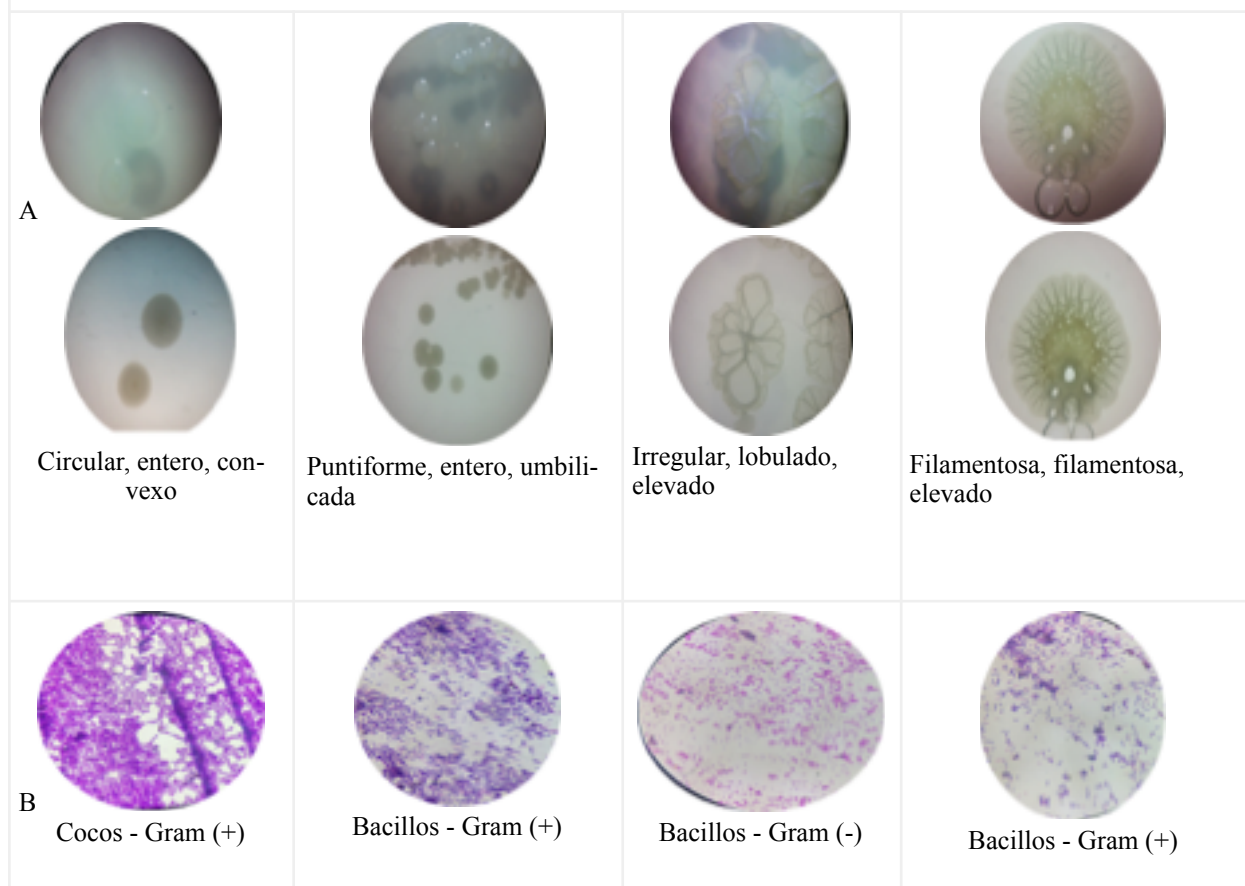
Los resultados observados en este trabajo son el promedio de datos por triplicado de cada una de las pruebas fisicoquímicas y bioquímicas. Los datos se agregaron a través de la aplicación y a través de la página web oficial de GLOBE (Figura 3). Consideramos como una fuente de error el hecho de que algunos datos no se recopilaban (durante diciembre) debido a las vacaciones escolares. En general, los datos se tomaron los viernes de todas las semanas alrededor del mediodía, pero a veces esa hora no fue posible para los compromisos académicos.

En la caracterización de las bacterias cultivables del reservorio, se aislaron 23 cepas bacterianas cuya morfología macroscópica osciló entre las formas puntiforme, circular, irregular y filamen-

tosa. Las elevaciones fueron convexas, umbilicadas y elevadas, en cuanto a los márgenes, se encontraron los siguientes tipos: enteros, lobulados y filamentosos. En cuanto a la tinción de Gram, se evidenció que la mayoría (20 de 23) eran Gram positivas y 3 Gram negativas (Figura 5).

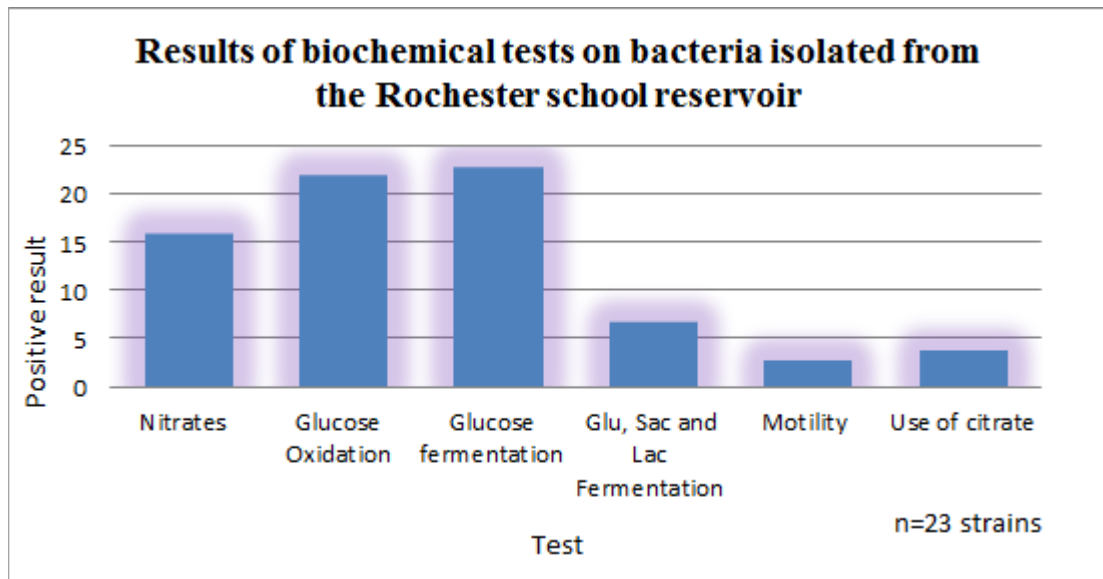
En la Figura 6, se puede observar la lectura de las muestras bioquímicas, que se basó en la preparación de un método específico de cultivo. Para la prueba, se utilizó un control positivo y uno negativo, en la mayoría de los casos el cambio de color indicó un resultado positivo y en el caso de las muestras de motilidad, se evidenció la turbidez del medio de cultivo. Se evaluaron los resultados de los aspectos del análisis metabólico, como la reducción de nitratos, el uso de citrato como

Figura 5. A) Principales características macroscópicas de las bacterias, forma, bordes y altura y B) Tinción de Gram y morfología celular de 23 bacterias aisladas del reservorio.

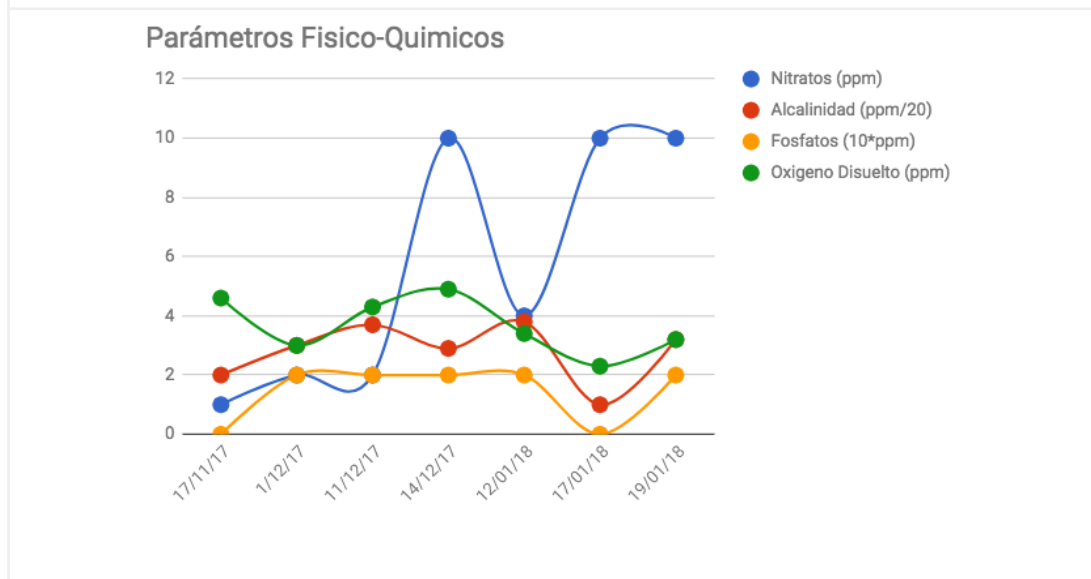


única fuente de carbono, la fermentación de azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa) y el uso de glucosa como carbono para vías fermentativas y oxidativas, como se observa en el Gráfico 1, la mayoría de las bacterias utilizan algunas como fuentes de carbono, como lactosa, sacarosa y glucosa, no solo para métodos oxidativos sino también fermentativos, lo que demuestra la versatilidad y capacidad de adaptación con respecto a las fluctuaciones en la cantidad de sustratos en el reservorio.

Gráfica 1. Resultados de las pruebas fisicoquímicas en bacterias aisladas del reservorio del Colegio Rochester



En cuanto a las muestras fisicoquímicas del agua del yacimiento observadas (gráfico 1 y tabla 1) podemos ver, por ejemplo, que la cantidad promedio de nitratos encontrados en el reservorio fue de aproximadamente 6 ppm, siendo 10 ppm el valor más alto y 1 ppm el más bajo. se observó que después de la cuarta recolección de datos, es decir desde mediados de diciembre, la concentración aumentó, aunque no de manera constantemente. Por lo general, este parámetro es muy fluctuante en los cuerpos de agua, debido a la contribución de las diferentes formas de nitrógeno en los cuerpos de agua, la cual en mayor parte es de tipo antropogénico, ya sea por desechos domésticos, el uso de fertilizantes, etc. En nuestro caso, la tierra donde se construyó la escuela cuenta con una inclinación que permite que toda el agua superficial y la lluvia lleguen al embalse, lo que podría arrastrar las sustancias ricas en nitrógeno, que pueden convertirse en formas más simples como nitratos y nitritos por efecto del metabolismo bacteriano. lo cual, colabora con la evidencia en el análisis del metabolismo bacteriano (Gráfico 1). Otro factor a tener en cuenta y que hemos observado es que, con la disminución de los niveles de lluvia y por ende nivel de agua en el reservorio, estos compuestos nitrogenados tienden a aumentar en el cuerpo de agua (Gráfico 2) (Pacheco Ávila, et Al. 2002). Las altas concentraciones de nitratos crean un ambiente carente de oxígeno, las concentraciones superiores a 0,9 ppm tienden a estimular el crecimiento de algas marinas e indican eutrofización, valores superiores a 20 ppm indican una alta tasa de contaminación en el cuerpo de agua. (Pérez-Castillo, et al., 2008), (Peña, O.S et al., 2006).

Gráfica 2. Resultados de los Parámetros Físicoquímicos en ppm


El oxígeno disuelto como los nitratos se considera una indicación de contaminación por materia orgánica debido a las descargas residuales, ya sean domésticas o industriales, en los cuerpos de agua. Las bajas concentraciones de oxígeno disuelto se pueden localizar donde la materia orgánica se descompone, lo que significa que las bacterias usan el oxígeno para descomponer los desechos, también son bajas en agua tibia de movimiento lento. Las aguas con concentraciones de oxígeno disuelto superiores a 4,1 mg / L se consideran optimas, en nuestro estudio, los niveles de oxígeno disuelto estuvieron entre 3 y 4,9 mg / L, lo que podría afectar la vida de algunos organismos acuáticos que requieran vivir ahí (Peña, OS et al. 2006). Sin embargo, En el año 2017, una estudiante de la Escuela Rochester realizó un proyecto comparando los parámetros físicoquímicos del agua del reservorio y la Laguna Fúquene, lugar donde vive una especie de pez en peligro de extinción, Capitán Sabana. Una vez que se observó que no había una diferencia significativa entre estos dos lugares evaluados, se concluyó que ese tipo de peces podría vivir en nuestro reservorio (Rodríguez, P.V. 2017).

Observamos que la disminución en la cantidad de oxígeno disuelto se relaciona con el aumento de la concentración de nitratos en el reservorio (Gráfica 2 y Tabla 1), esto también va a un nivel microbiológico, donde las bacterias cultivadas mostraron tener ambos metabolismos (oxidativo y fermentativo) (Gráfico 1). Aunque los niveles que se muestran en el reservorio no son alarmantes, es necesario seguir monitoreando y estudiando formas de mejorar dichos parámetros ya que se ha documentado que la disminución de oxígeno disuelto no solo contribuye al aumento de los nitratos via metabolismo bacteriano también las concentraciones de hidróxido de man-

ganeso, hierro y sulfatos. El hecho de propiciar las condiciones reductoras en el medio ambiente puede ser tóxico para los peces y los organismos superiores, además estos compuestos reducidos mantienen la interfaz de sedimento-agua y evitan la acumulación de capas de hidróxido de hierro. Con la pérdida de hierro en el agua que lo cubre, disminuye la capacidad de retención de fósforo del sedimento. Lo anterior también puede explicar los resultados que obtuvimos. Los resultados dados para los fosfatos fueron considerablemente constantes a lo largo de la recolección de datos (Tenían un rango de 0-0,2 y su promedio era de 0,2 ppm) (Friedl, G., & Wüest, A. 2002)

Como se muestra en los resultados, los niveles de transparencia variaron entre 22 cm y 30 cm. La transparencia promedio fue de 24.6 cm. Usamos un disco Secchi hecho a mano para hacer estas mediciones. Los niveles promedio de alcalinidad encontrados fueron de 56 ppm, siendo el valor más alto de 78 ppm y 20 ppm el más bajo. Probablemente podamos inferir que el valor más bajo (20 ppm) puede ser un valor atípico dada su diferencia de los otros datos. La alcalinidad es una medida que tiene una relación directa con el pH, ya que ambos miden los cambios de ácidos en el agua, los cambios extremos en Alcalinidad tienen un impacto directo en los niveles de pH; ya que un nivel más alto de alcalinidad en el agua ayudará a evitar los mayores impactos en los cambios en los niveles de pH, y como consecuencia ayudará a la propagación de la vida, ya que ayuda a proteger el medio ambiente de estos grandes cambios. La alcalinidad también está determinada por el suelo y el terreno que rodea el cuerpo de agua, ya que sus componentes pueden alterar los productos químicos del agua cuando se diluyen. (Sr. Brian Oram, P. 2018)

El pH del reservorio mostró tener un rango entre 6.0-7.5, aunque los niveles de pH promedio fueron de aproximadamente 6.7, los cuales son casi neutros y podrían indicar que es apta para mantener la vida de otros organismos, ya que el pH se considera como un indicador de la calidad del agua en general, cuánto se ve afectada por agentes externos. Los cambios en el pH pueden indicar la inserción de fertilizantes, particularmente cuando se registran medidas continuas a lo largo de la conductividad del cuerpo de agua y los procesos de eutrofización, si están asociados con el proceso de fotosíntesis y la respiración de las algas. Además, el pH afecta la toxicidad de algunos compuestos como el amoníaco al controlar su ionización, como la disponibilidad biológica de ciertos contaminantes, como los metales pesados. Los valores superiores a 9.0 e inferiores a 5.8 producen limitaciones en el desarrollo y la fisiología de los organismos acuáticos. (Pérez-Castillo, et al., 2008).

Conclusiones

- Durante el tiempo de medición, la cantidad de oxígeno disuelto disminuyó progresivamente mientras aumentaba la concentración de nitratos, esta tendencia también se relacionó con el aumento de la temperatura, la cual es crucial para la retención de oxígeno en el agua y aunque los niveles de oxígeno no disminuyeron drásticamente sus niveles en este momento se encuentran en el límite superior para que cualquier organismo pueda vivir en nuestro reservorio.
- Parámetros como fosfatos, pH y alcalinidad no mostraron variaciones significativas con el tiempo y las cambiantes condiciones climáticas, tanto el pH como la alcalinidad no mostraron dependencia de los otros parámetros analizados, y mostraron que el reservorio es factible para soportar la vida de otros organismos. La baja concentración de los fosfatos, como se mencionó anteriormente, puede estar relacionada con la presencia de nitratos, aunque existen estudios adicionales para determinar por qué las concentraciones bajas de fosfato.
- Las bacterias aisladas y caracterizadas mostraron ser en su gran mayoría Gram positivas, con capacidades metabólicas tanto oxidativas como fermentativas, y el uso preferencial de carbohidratos con respecto a sustratos como el citrato. También mostraron una alta capacidad para reducir los nitratos a nitritos, y esto podría explicar cómo los excesos de la materia orgánica disponible es utilizada por los microorganismos y por qué este parámetro es tan fluctuante.

Bibliography / appointments

- i. RennCE. Investigating water problems: Manual a water analysis. Chestertown MD: Educational Products Division, La Motte Chemical Product Company 1970; p. 72.
- ii. Zapata, H. A. V. (2004). *Manual de prácticas de microbiología básica*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.
- iii. Pérez-Castillo, A. G., & Rodríguez, A. (2008). Índice fisicoquímico de la calidad de agua para el manejo de lagunas tropicales de inundación. *Revista de Biología tropical*, 56(4), 1905-1918.
- iv. Mora, X. (2012). *DIFERENCIANDO BACTERIAS GRAM y GRAM-*. Secciones Avícolas; p. 25.
- v. Anonymous. (December 1st, 2016). Dissolved Oxygen. *The Globe Program*.
- vi. Pulla, E. Calidad de Agua, Trabajo de Investigación Oxígeno Disuelto. Escuela Superior Politécnica del Litoral. (Guayaquil, Junio 26, 2007)
- vii. Anonymous. (December 1st, 2016). Alkalinity. *The Globe Program*.
- viii. Pacheco Ávila, J., Pat Canul, R., & Cabrera Sansores, A. (2002). Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Ingeniería*, 6(3).
- ix. PEÑA, O. S., RUBALCABA, S. C., NOVO, M. F., RODRÍGUEZ, Y. H., & PÉREZ, A. (2006). Evaluación físico-química y microbiológica del agua de la presa El Cacao (Cotorro, Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*, 6, 202-206.
- x. Friedl, G., & Wüest, A. (2002). Disrupting biogeochemical cycles-Consequences of damming. *Aquatic Sciences*, 64(1), 55-65.
- xi. Rodríguez, P.V. (2017). Endangered fish *Eremophilus mutisii* now part of Rochester's Community. *RocheSTEM*, 2422-4413; p. 34.
- xii. Mr. Brian Oram, P. (2018). *Water Research Center - Alkalinity and Stream Water Quality*. water-research.net