



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE QUIMICA



**ESTUDIO DE LOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LOS  
PROBLEMAS DE SEDIMENTACIÓN DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO  
BIOLÓGICO DE EFLUENTES DE REMOCIÓN DE NITRÓGENO.**

por

**Patricia Draper**

TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCION DEL TÍTULO DE

**MAGÍSTER EN QUÍMICA.**

DIRECTORES: Dra. Claudia Etchebere (Cátedra de Microbiología, DepBio)  
Dra. Laura Franco Fraguas (Cátedra de Bioquímica, DepBio)

FACULTAD DE QUIMICA  
Cátedra de Microbiología, DepBio

**Diciembre, 2010**



## AGRADECIMIENTOS

A Fabián por impulsarme, por estar siempre presente, por apoyarme en todas las decisiones, por su soporte técnico.

A mis padres por cuidar de mis hijos para poder estudiar, por motivarme para terminar con la tesis, por su apoyo y su ayuda incondicional.

A Claudia por su paciencia, por confiar en mi, por compartir sus conocimientos.

A Laura por su buena onda, por su flexibilidad, por compartir sus conocimientos

A las gente de micro en especial a la gente del tercero; Ana, Silvana, Javier, Lucia, Jimena, Guadalupe, Dayana, Ángela e Inés por compartir sus conocimientos, por las risas, por los buenos momento.

A Sabrina, que sin ella no hubiera podido terminar con los ensayos.

A Analía por las fotos.

A mis compañeras de OSE por cuidar el boliche en mis ausencias.

A mis hijos por el tiempo que me dieron para terminar con la tesis.

A mis amigas por estar presentes, simplemente por ser mis amigas.

Al PDT 54/93 y a PEDECIBA Química por financiar parte de este trabajo.



## RESUMEN

La remoción de contaminación nitrogenada de aguas residuales industriales suele realizarse usando sistemas biológicos de tratamiento que acoplan procesos de nitrificación y desnitrificación. En estos sistemas es necesario que la biomasa quede retenida en el reactor. Para ello es importante la formación de gránulos o flóculos con una buena capacidad de sedimentación de manera de poder separar la biomasa del agua tratada. Sin embargo, frecuentemente se reportan problemas de flotación de la biomasa que se asocian a la retención de burbujas de  $N_2$ . Se sabe poco aún de las causas microbiológicas que producen esta mala sedimentación y de qué parámetros se pueden modificar para evitar estos problemas.

El objetivo de este trabajo es estudiar las diferentes propiedades de sedimentación de los lodos de sistemas de tratamiento biológico de efluentes de remoción de Nitrógeno y encontrar las condiciones necesarias para que los lodos presenten buenas propiedades de sedimentación. Se analizaron muestras de dos de estos reactores de laboratorio que presentaron problemas de sedimentación (identificados como reactores M y F) y de un reactor que no presentó problemas de sedimentación durante la operación (reactor B).

Se estudiaron las características fisicoquímicas de los lodos y sus propiedades de desnitrificación. Los resultados mostraron que una alta relación proteínas/carbohidratos en los exopolímeros, una alta actividad desnitrificante, un alto número de bacterias desnitrificantes y una alta relación SSV/SST son características relacionadas con la mala sedimentación de los lodos.

Para evaluar si la mala sedimentación se debe al predominio de determinado organismo desnitrificante se aislaron cepas de los tres reactores que se caracterizaron, utilizando métodos clásicos y métodos de biología molecular. Los 63 aislamientos se afiliaron a los géneros: *Thauera*, *Acidovorax*, *Paracoccus*, *Hidrogenophaga*, *Trichococcus*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azonexus*, *Shinella*, *Ochrobactrum* y *Brachymonas*. No se detectó un microorganismo preponderante en la muestra de los reactores F y M que pueda explicar la mala sedimentación de la biomasa de esos reactores. Se estudió la comunidad microbiana del reactor B mediante T-RFLP del gen ARNr 16S y del gen *nirS* así como también se realizó una biblioteca de clones del gen del ARNr 16S. Se observó una correlación entre los aislamientos y los picos más abundantes en los cromatogramas del T-RFLP tanto de *nirS* como del gen del ARNr 16S confirmando el predominio de los aislamientos en el sistema.

Se determinó la actividad específica desnitrificante y la capacidad de agregación de los aislamientos en diferentes condiciones de cultivo utilizando distintos sustratos y concentraciones de nitrato. Una mayor proporción de cepas aisladas del reactor M presentaron agregación positiva comparado con el número de ensayos positivos de las cepas aisladas del reactor B. Dos de las 6 cepas estudiadas presentaron resultados de agregación diferentes con los distintos sustratos. Sin embargo la relación carbono/nitrato del medio de cultivo no afectó las propiedades de agregación.

En conclusión los resultados obtenidos muestran que la relación de biomasa/ sólidos suspendidos fijos y la elección del sustrato es importante para que un lodo tenga buenas propiedades de sedimentación.



# ÍNDICE



<b>ÍNDICE GENERAL</b>	
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE GENERAL .....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABLA .....	17
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
DESNITRIFICACIÓN .....	21
Definición .....	21
Reacciones parciales: .....	21
Ciclo del Nitrógeno.....	22
Enzimas claves involucradas en la desnitrificación.....	23
Microorganismos que desnitrifican.....	24
Estudio de bacterias desnitrificantes.....	25
Criterios para determinar la capacidad de desnitrificar de microorganismos aislados. ....	28
Estudio del proceso de desnitrificación en diferentes ecosistemas.....	29
SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES .....	30
Problemas de sedimentación en reactores de tratamiento de efluentes.....	33
EXOPOLIMEROS - ExoP (EXTRACELULAR POLIMERIC SUBSTANCES).....	34
ANTECEDENTES.....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	39
OBJETIVO GENERAL.....	41
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	41
PREGUNTAS A RESPONDER .....	43
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	45
<i>Estudio de las características de lodos con diferentes capacidades de sedimentación</i> .....	45
OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	47
MÉTODOS.....	47
Extracción de Exopolímeros (ExoP) a partir de lodos .....	49
Determinación de proteínas y carbohidratos en los exopolímeros extraídos .....	49
Gel filtración de los ExoP del lodo B .....	49

Obtención del perfil de bandas proteicas de los EXoPolímeros mediante electroforesis	50
Determinación de la actividad desnitrificante de los lodos .....	50
Recuento de bacterias desnitrificantes por numero más probable (NMP) .....	51
Determinación del índice volumétrico de lodos (IVL). .....	51
RESULTADOS .....	51
Puesta a punto de la extracción de ExoP de lodos .....	51
Composición química de los expolímeros extraídos de los lodos .....	56
Gel filtración .....	58
Actividad desnitrificante y recuento por NMP de bacterias desnitrificantes de los lodos	59
Relación de SSV (sólidos suspendidos volátiles)-SST (sólidos suspendidos totales) en los lodos .....	61
DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES .....	64
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	65
<i>Aislamiento y caracterización de las cepas desnitrificantes predominantes en la biomasa de reactores con diferente capacidad de sedimentar.....</i>	65
OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	67
MÉTODOS.....	67
Optimización de técnicas de aislamiento de cepas desnitrificantes .....	67
Aislamiento y caracterización de las cepas obtenidas a partir de las diferentes muestras de lodos.....	70
Determinación de la capacidad desnitrificante de las cepas mediante la técnica de bloqueo por acetileno .....	71
Análisis de las secuencias de clones de una biblioteca del gen del ARNr 16S.....	72
T- RFLP del gen del ARNr 16S en muestras de lodos .....	72
Estudio de la diversidad de bacterias desnitrificantes mediante T-RFLP <i>nirS</i> .....	73
RESULTADOS .....	74
Optimización de las técnicas de aislamiento de cepas desnitrificantes .....	74
Aislamiento y caracterización de cepas desnitrificantes a partir de muestras de los lodos B, M y F.....	77
Análisis de las secuencias de clones de una librería del gen del ARNr 16S.....	82
Análisis de la comunidad microbiana de muestras del reactor B mediante T- RFLP del gen ARNr 16S .....	85

Estudio de la diversidad de bacterias desnitrificantes mediante T-RFLP del gen <i>nirS</i> .....	87
DISCUSIÓN.....	88
Optimización del método de aislamiento.....	88
Diversidad de los aislamientos.....	90
Correlación de los aislamientos con la comunidad microbiana total .....	93
CONCLUSIONES.....	95
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	97
<i>Características de agregación de los aislamientos y efecto de diferentes condiciones de cultivo en la agregación.....</i>	97
OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	99
MÉTODOS.....	99
Determinación de la capacidad de agregación de los aislamientos .....	99
Determinación de la capacidad de desnitrificar con diferentes sustratos .....	100
Determinación de la actividad desnitrificante de las cepas .....	100
RESULTADOS .....	100
Capacidad de agregación de los cultivos .....	100
Agregación con diferentes concentraciones de nitrato.....	105
Capacidad de desnitrificación de los cultivos .....	107
DISCUSIÓN.....	109
Características de agregación de los aislamientos .....	109
Efecto de las condiciones de cultivo sobre la agregación .....	110
Correlación entre actividad desnitrificante y agregación .....	111
CONCLUSIONES.....	112
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	113
CONCLUSIONES FINALES .....	115
PERSPECTIVAS .....	115
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	117
<b>ANEXOS</b> .....	125
ANEXO 1: Determinación de proteínas por LOWRY .....	127
ANEXO 2: Determinación de azúcares por técnica fenol sulfúrico .....	128
ANEXO 3: Determinación de azúcares por Di-Nitro Salicílico (DNS) .....	128
ANEXO 4: PROTEIN ASSAY REAGENT (BCA) .....	128

ANEXO 5: Medio de cultivo BCY .....	129
ANEXO 6: ARDRA.....	131
ANEXO 7: Lisis alcalina de células .....	132
ANEXO 8: Secuencias de los primers utilizados .....	133
ANEXO 9: Amplificación del gen <i>nirS</i> y <i>nirK</i> .....	133
ANEXO 10: T-RFLP del gen del ARNr 16S .....	134
ANEXO 11: T-RFLP del gen <i>nirS</i> .....	137
ANEXO 12: Determinación de la actividad desnitrificante de cultivos puros. ....	140

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de Nitrógeno (Travers, 2008) .....	22
Figura 2: Esquema del protocolo para T-RFLP extraído de Cabezas (2005).....	28
Figura 3: Etapas del ciclo de operación de un reactor SBR nitrificante-desnitrificante (Travers, 2008). .....	32
Figura 4: Muestra de un lodo de un sistema de tratamiento de efluentes de lodos activados con problemas de sedimentación. A la izquierda se muestra el lodo a tiempo cero y a la derecha se muestra el lodo media hora después. Se observa la flotación de la biomasa. ....	33
Figura 5: Microfotografía de un flóculo de una muestra de lodo de un sistema de lodos activados con problemas de bulking filamentoso. ....	33
Figura 6: Perfiles de SDS-PAGE en geles con gradiente 4-15% (Gel A) y homogéneos 7.5 (Gel B). De izquierda a derecha en ambos geles: Muestras correspondientes a los ensayos A, C, D, E y F mediante sonicación. PM estándares de peso molecular. Tinción con plata...	54
Figura 7: Curva de calibración para los PM en función de la distancia recorrida en Gel B. ...	54
Figura 8: Perfiles de SDS-PAGE en geles con gradiente 4-15 (gel A) y homogéneos 7.5 (gel B). De izquierda a derecha: Muestras de los ExoP extraídos de los lodos de los reactores B, F y M y el marcador de peso molecular. Tinción con plata. ....	56
Figura 9: Curva de calibración para los PM en función de la distancia recorrida en el gel con gradiente 4-15. ....	57
Figura 10: Curva de calibración para los PM en función de la distancia recorrida en el gel homogéneo 7,5. ....	57
Figura 11: Valores de Actividad desnitrificante ( $\text{mgNO}_3^-/\text{h} \cdot \text{gSSV}$ )/NMP/gSSV de las diferentes muestras estudiadas de reactores los M, F y B.....	60
Figura 12: Relación SSV/SST de los reactores M, B y F a lo largo del tiempo. ....	61
Figura 13: Esquema de la estrategia que utiliza como medio de cultivo agar con lodo autoclavado en el centro de la placa. ....	69
Figura 14: Géneros de las cepas aisladas con las diferentes estrategias estudiadas. Los géneros se determinaron de acuerdo a la secuencia del gen del ARNr 16S. ....	74
Figura 15: La foto muestra la placa de medio utilizada en la estrategia M luego de ser incubada a 37 °C.....	76

Figura 16: Géneros de cepas desnitrificantes aisladas en las diferentes muestras del lodo del reactor B, utilizando únicamente las estrategias A y E.....	79
Figura 17: Géneros de las bacterias desnitrificantes asilados en cada uno de los lodos de tres reactores utilizando las estrategias A y E.....	79
Figura 18: Cantidad de cepas desnitrificantes del lodo del Reactor B aisladas a lo largo del tiempo y su caracterización de acuerdo a la secuencia del gen del ARNr 16S (las cepas se agruparon por género al cual pertenecen). .....	80
Figura 19: Árbol filogenético del gen ARNr 16S de una biblioteca de clones de una muestra del lodo del reactor B y secuencias de asilamientos. Los números cerca de los nodos indican los valores de bootstrap calculados en base a 100 set de datos. La barra indica la cantidad de mutaciones en 100. ....	83
Figura 20: Distribución de las secuencias de clones de la biblioteca de genes de ARNr 16S de acuerdo al análisis filogenético efectuado en la muestra del reactor B de octubre del 2005. ....	84
Figura 21: Distribución de las secuencias del gen del ARNr 16S de cepas aisladas del lodo del reactor B de las muestras de setiembre y diciembre 2006 utilizando diferentes estrategias.....	84
Figura 22: Esquema del perfil de T-RFLP del gen ARNr 16 S de las muestras de set 2006 y dic 2006 del lodo del reactor B con la enzima <i>HhaI</i> . En el eje x se indica el tamaño de los fragmentos (en nucleótidos) en el eje y la abundancia relativa calculada a partir de la intensidad de fluorescence. ....	85
Figura 23: Esquema del TRFLP- <i>nirS</i> de lodo B en diferentes fechas utilizando la enzima de digestión <i>HhaI</i> . En el eje de las x se encuentra el tamaño del fragmento y en el eje de las y el porcentaje de abundancia de cada fragmento. ....	87
Figura 24: Resultados de los aislamientos obtenidos en la optimización de los métodos de aislamiento de este trabajo comparado con los obtenidos en el trabajo de Heylen et al. (2006). En la parte superior de la figura se muestran los resultados de los aislamientos del trabajo de Heylen et al. 2006 y en la parte inferior se muestran los aislamientos de este trabajo de tesis. Para estos gráficos solo se consideraron los géneros de cepas desnitrificantes. ....	90
Figura 25: Fotografía del cultivo en medio líquido de la cepa M01 donde se observa que la agregación de la biomasa está asociada a la retención de burbujas y a la flotación de la biomasa.....	101

Figura 26: Fotografía del cultivo en medio líquido de la cepa B20 donde se muestra la retención de burbujas por los agregados y la flotación de la biomasa. ....	101
Figura 27: Variación del porcentaje de agregación de un cultivo de la cepa B66, B62, M17 y M05 en el medio BCY suplementado con acetato y nitrato cultivo a lo largo de la curva de crecimiento. ....	102
Figura 28: Porcentaje de agregación de las cepas aisladas de los lodos de los reactores B, M y F. ....	103
Figura 29: Géneros de los aislamientos y sus respectivos porcentajes de agregación en medio BCY con acetato como sustrato. ....	105



## ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Características de los reactores de los sistemas de tratamientos estudiados.....	48
Tabla 2: Efectos de la Temperatura y la Agitación en la extracción de los ExoP del lodo B..	52
Tabla 3: Comparación de diferentes condiciones de extracción usando tratamiento por sonicación. ....	53
Tabla 4: Comparación de extracción de ExoP usando diferentes solventes.....	53
Tabla 5: Determinación de Carbohidratos, proteínas y de la relación P/C, (relación proteínas carbohidratos) de los ExoP extraídos con el tratamiento A mediante ultrasonido.....	58
Tabla 6: Resultados obtenidos mediante método del BCA en las tres fracciones recogidas de la columna de gel filtración. ....	59
Tabla 7: Recuento por NMP de bacterias desnitrificantes, actividad desnitrificante y SSV de los lodos estudiados en muestras tomadas en diferentes fechas. ....	60
Tabla 8: Relación promedio SSV/SST de los tres sistemas de tratamiento estudiados y sus respectivas desviaciones estándar.....	61
Tabla 9: IVL de los lodos en muestras tomadas de los reactores en diferente fechas.....	62
Tabla 10: Diferentes estrategias utilizadas para optimizar el aislamiento de cepas desnitrificantes. ....	68
Tabla 11: Cepas aisladas con cada estrategia y características de las mismas. ....	75
Tabla 12: Resultados del estudio de la optimización de las estrategias utilizadas para aislar bacterias desnitrificantes. ....	76
Tabla 13: Cepas aisladas de muestras de los lodos de los reactores B, F y M. ....	78
Tabla 14: Cepas aisladas de los lodos de los reactores B, F y M. ....	81
Tabla 15: Corte “ <i>in silico</i> ” de las secuencias del gen del ARNr 16S utilizando la enzima <i>HhaI</i> de las cepas aisladas. ....	86
Tabla 16: Resumen de las cepas aisladas en los lodos de los reactores B, M y F y detección de las mismas por técnicas de biología molecular. ....	92
Tabla 17: Porcentajes de agregación de diferentes aislamientos en medio BCY con acetato y nitrato. ....	103
Tabla 18: Resultados del ensayo de agregación de las cepas aisladas de los lodos de los reactores B, F y M, género al que pertenecen de acuerdo al análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S y perfil de ARDRA. ....	104

Tabla 19: Ensayo de agregación de las diferentes cepas utilizando medio BCY con diferente relación Carbono-nitrógeno (C/N). .....	106
Tabla 20: Ensayo de agregación de diferentes cepas en medio BCY con acetato (AC) y etanol (ET) como sustrato. ....	107
Tabla 21: Porcentaje de producción de N <sub>2</sub> O para las diferentes cepas utilizando como sustrato acetato, etanol y metanol.....	108
Tabla 22: Actividad desnitrificante y porcentaje de agregación de las diferentes cepas. ....	108

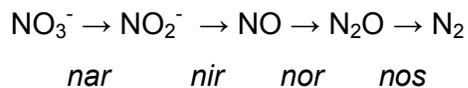
# **INTRODUCCIÓN**



## DESNITRIFICACIÓN

### Definición

La desnitrificación se define como la respiración anaerobia en la cual el aceptor externo de electrones es  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  que se reduce a  $\text{N}_2$  gas, teniendo como intermediarios el nitrito,  $\text{NO}$  y  $\text{N}_2\text{O}$ . Este proceso es modulado por 4 enzimas: la nitrato reductasa, la nitrito reductasa, la oxido nítrico reductasa y la oxido nitroso reductasa. Estas enzimas son codificadas por los genes; *nar* (nitrato reductasa), *nir* (enzima nitrito reductasa), *nor* (oxido nitrito reductasa) y *nos* (oxido nitroso reductasa). A continuación se muestra la secuencia general y las ecuaciones parciales (Heylen et al., 2007).



### Reacciones parciales:



La desnitrificación es un proceso biogeoquímico muy importante ya que forma parte del ciclo global del nitrógeno y retorna el nitrógeno fijado a la atmósfera.

## Ciclo del Nitrógeno

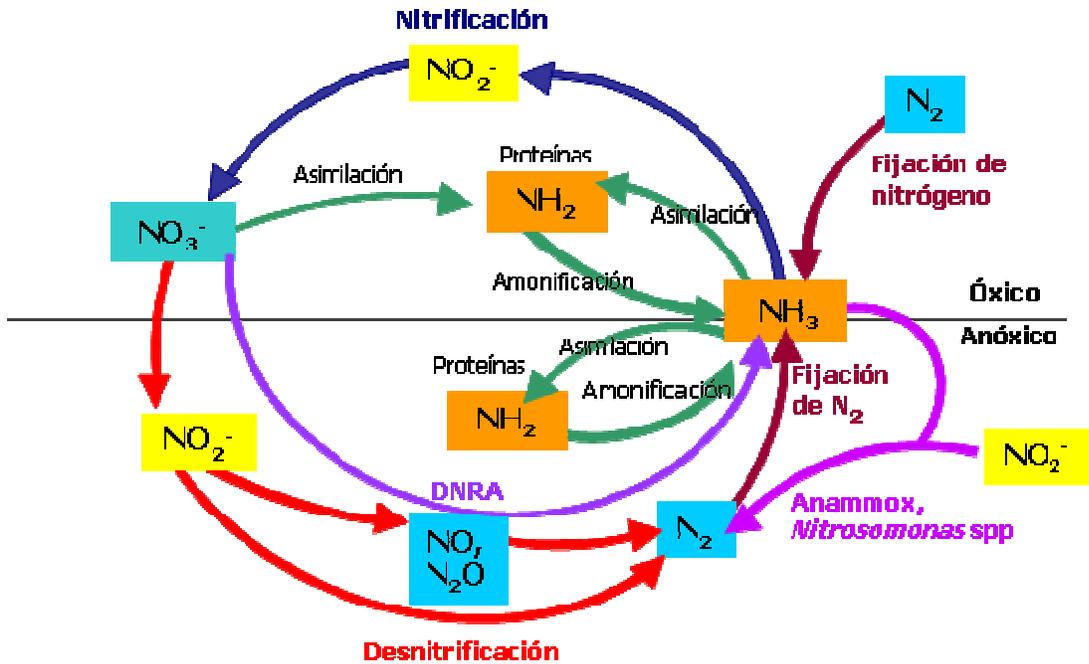


Figura 1: Ciclo de Nitrógeno (Travers, 2008)

El nitrógeno cuya valencia estable oscila entre -3 en el amoníaco ( $\text{NH}_4^+$ ) y el +5 en el  $\text{NO}_3^-$ , se encuentra en la naturaleza en muchos estados de oxidación. El nitrógeno es componente de los aminoácidos, los nucleótidos, los amino azúcares, está así presente también en los diferentes polímeros en los que participan estas moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, entre otros). El nitrógeno gaseoso  $\text{N}_2$  constituye el 79 % de los gases de la atmósfera y es un reservorio importante aunque de incorporación lenta y difícil. El nitrógeno fijo en la naturaleza se encuentra en la materia orgánica y en minerales en forma de nitrato y amonio. El ciclo biogeoquímico de nitrógeno depende en gran medida de los microorganismos, procesos claves del ciclo sólo ocurren gracias a la acción de determinados microorganismos (Etchebehere, 2007).

Uno de los procesos claves del ciclo es la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, que es llevada a cabo por algunos microorganismos llamados fijadores de nitrógeno que pueden tener vida libre o en asociación con plantas. Este proceso implica la ruptura del triple enlace de la molécula de  $N_2$  por lo cual consume mucha energía. Una de las enzimas involucradas en la fijación de nitrógeno es la nitrogenasa que se inhibe en presencia de concentraciones altas de oxígeno por lo cual este proceso se realiza en microaerofilia. Este proceso en los suelos es llevado a cabo por microorganismos de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, *Azobacter* y *Beijerinckia*, mientras que en ambientes acuáticos prevalecen organismos de la familia Cianobacterias (Etchebehere, 2007).

El amonio es asimilado por los seres vivos que lo integran a su biomasa. El amonio en condiciones aeróbicas puede ser oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato por un proceso llamado nitrificación. El nitrato en condiciones anaeróbicas es reducido a nitrito, NO,  $N_2O$  y finalmente  $N_2$  gaseoso por un proceso desasimilativo llamado desnitrificación. Este proceso es una respiración anaeróbica y los microorganismos responsables en general son heterótrofos que también pueden respirar oxígeno en condiciones aeróbicas. En condiciones anaeróbicas el nitrato puede ser reducido a amonio por un proceso asimilativo o por un proceso desasimilativo. Este proceso es llevado a cabo por bacterias fermentadoras que compiten por el nitrato con las bacterias desnitrificantes en condiciones anaerobias. Existen otros procesos relacionados con el ciclo del nitrógeno que aún han sido poco estudiados y no se conoce su importancia a nivel del ciclo global del nitrógeno. Ejemplo de estos procesos son la oxidación anaeróbica del nitrógeno (anammox), la nitrificación heterótrofa y la desnitrificación en condiciones aeróbicas (Etchebehere, 2007).

### **Enzimas claves involucradas en la desnitrificación**

La conversión de nitrito en óxido nítrico es el paso crucial en la desnitrificación ya que convierte el nitrógeno fijo en nitrógeno gaseoso (NO). Este NO gas es posteriormente reducido a  $N_2O$  por la acción de la óxido reductasa. El control de estas dos reductasas es llevado a cabo por el NO, que durante la desnitrificación su concentración se encuentra en el orden de los nanomoles, siendo tóxico para las bacterias desnitrificantes. En la naturaleza existen dos enzimas nitrito reductasas una es el citocromo  $cd_1$  ( $cd_1NiR$ ) y la otra es la cobre dependiente (CuNiR). Una codificada por el gen *nirS* ( $cd_1NiR$ ) y otra por el gen *nirK* (CuNiR). Estas enzimas tienen la misma función y están presentes una o la otra en las bacterias

desnitrificantes. Diferentes enzimas pueden estar presentes en organismos del mismo género e incluso se ha reportado que diferentes cepas de *Alcaligenes fecalis* presentaron diferentes enzimas. En general la enzima  $cd_1NiR$  es más abundante numéricamente en el ambiente pero la enzima  $CuNiR$  se presenta en una diversidad mayor de organismos (Heylen, 2007).

### **Microorganismos que desnitrifican**

En la revisión de literatura realizada en este trabajo solo se discuten los aspectos de la desnitrificación en general, teniendo en cuenta únicamente los organismos desnitrificantes del Dominio Bacteria. No se consideró: archaeas (Cebello et al., 2004) ni hongos (Tielens et al., 2002).

La respiración de nitrato con nitrito como producto final es la variante más común en los organismos procariotas. De hecho la mayoría de las bacterias que respiran el nitrato no tienen la capacidad de desnitrificar. Por otro lado otras bacterias pueden desnitrificar a partir del nitrito pero no pueden respirar el nitrato. La existencia de estas variables truncadas de la desnitrificación dificulta la identificación de bacterias desnitrificantes (Heylen, 2007).

Existen otros procesos que generan  $N_2O$  o  $N_2$  a partir de nitrato o nitrito como la reducción desasimilativa del amonio, la asimilación de nitrato (Tiedje et al., 1998), la oxidación anaeróbica de amonio (Jetten et al., 1997) o la asimilación metanótrofa de nitrato acoplada a la desnitrificación de nitrito (Ren et al., 2000).

Las bacterias desnitrificantes pertenecen a una gran variedad de grupos fisiológicos y están filogenéticamente dispersas, ubicadas en ramas evolutivas muy diversas. En todos los dominios del árbol filogenético encontramos organismos con la capacidad de desnitrificar, sin embargo las bacterias desnitrificantes más frecuentemente aisladas se afilian dentro de las subclases alfa, beta, gama o épsilon de *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* aunque no siguen un patrón de distribución reconocible (Zumft et. al, 1997). Tres grupos de bacterias se han considerado como que no son verdaderamente desnitrificantes: a) bacterias Gram positivas que no pertenecen al género *Bacillus*, b) *Enterobacteriaceae*, y c) anaerobios obligados. La bacterias Gram positivas no han sido incluídas frecuentemente en los trabajos de investigación, aunque se han encontrado especies del genero *Bacillus* que desnitrifican

como por ejemplo *B. subtilis* y *B. azotoformans*. No se han encontrado microorganismos desnitrificantes en la familia *Enterobacteriaceae*, sin embargo muchos organismos de esta familia son capaces de reducir nitrato a nitrito. No se han reportado hasta ahora bacterias desnitrificantes anaeróbicas obligadas (Heylen, 2007) (Tiedje, 1998). La gran mayoría de las bacterias desnitrificantes son aerobias heterótrofas con la capacidad de reducir el nitrato a nitrógeno en anaerobiosis, dentro de las bacterias Gram negativas los géneros más frecuentemente reportados son *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Acidovorax*, y organismos pertenecientes a géneros recientemente descritos como *Thauera* y *Brachymonas*. También se ha reportado bacterias organótrofas gram positivas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Jonesia*, si bien se aíslan con menor frecuencia (Zumft et al., 1997).

Aunque el proceso de desnitrificación en general es anóxico, las bacterias desnitrificantes pueden tener diferentes umbrales de oxígeno e incluso necesitar el oxígeno para realizar el proceso. Por ejemplo *Paracoccus pantotrophus* (denominado anteriormente *Thiosphaera pantotropha*) puede desnitrificar bajo la saturación total del aire (Kuenen et al., 1998), mientras que bacterias nitrificantes que pueden desnitrificar son aerobios obligados y por lo tanto necesitan oxígeno para completar la desnitrificación. Estos desnitrificantes nitrificantes son un buen ejemplo de la desnitrificación quimiolitótrofas, que fue descubierta cuando se observó la producción de  $N_2O$  a partir de nitrito por *Nitrosomonas europaea* (Poth et al., 1985) (Schmidt et al., 2004).

Las bacterias oxidadoras de amonio pueden realizar los dos procesos, lo que sugiere que las bacterias nitrificantes desnitrificantes puede ser un rasgo universal entre las beta *Proteobacteria* (Shaw et al., 2006). Todas las demás ramas principales del ciclo de nitrógeno pueden estar asociadas con desnitrificación, excepto la amonificación. Especialmente la desnitrificación ha sido frecuentemente reportada en bacterias diazotróficas, por ejemplo, en *Rhizobium* (O'Hara et al., 1985), *Bradyrhizobium* (Vairinhos et al., 1989), *Sinorhizobium* (Chan et al., 1989), *Azoarcus* (Zhou et al., 1995).

### **Estudio de bacterias desnitrificantes**

Mediante el cultivo de bacterias desnitrificantes se puede obtener información acerca de la capacidad de desnitrificar y la funcionabilidad de los genes así como también la posición

filogenética del organismo. Desafortunadamente las técnicas de cultivo empleadas no recuperan toda la diversidad de bacterias desnitrificantes presentes en el ambiente (Heylen, 2007).

#### Métodos dependientes del cultivo

El cultivo en placas con agar convencional es el método donde los microorganismos crecen más rápido, con una mayor densidad. Los métodos que involucran diluciones permiten eliminar las bacterias que crecen más rápidamente y permiten aislar bacterias que anteriormente no pudieron ser aisladas. Otras técnicas utilizadas involucran la difusión en cámaras de crecimiento, incubar las muestras en sus ambientes naturales donde se permite la difusión de los nutrientes. Sin embargo simplemente prolongando el tiempo de incubación o con bajas concentración de nutrientes se puede aumentar significativamente la cantidad de bacterias cultivables (Heylen, 2007).

El trabajo de Tiedje et al., (1998) recomienda TSA suplementado con 0,1 % de nitrato de potasio como el medio más favorable para el crecimiento de la mayoría de las bacterias heterótrofos desnitrificantes. El caldo nitrato con agar es usado para el cultivo de bacterias del suelo (Cheneby et al., 2000) (Gamble et al., 1977) (Weier et al., 1992). En el trabajo de Heylen et al. (2006) se recomienda utilizar como sustrato etanol o succinato y una relación carbono nitrato de entre 18 y 20 para aislar bacterias desnitrificantes.

#### Métodos de biología molecular para estudiar comunidades desnitrificantes

Debido a la gran diversidad filogenética de las bacterias desnitrificantes, es muy difícil encontrar un método basado en el gen del ARNr 16S para su estudio en comunidades complejas. Por lo tanto se han desarrollado métodos basados en genes funcionales involucrados en la desnitrificación como *narH*, *nirS* y *nirK* y *nosZ* (Philippot et. al., 2002).

Las técnicas de biología molecular empleadas para el estudio de bacterias desnitrificantes presentan un sesgo ya que los protocolos descritos para la extracción de ADN no son adecuados para todas las bacterias además, los primers están diseñados para grupos específicos de bacterias y amplifican genes que pueden ser no funcionales (Heylen, 2007).

La cuantificación de bacterias desnitrificantes del ambiente se ha basado en los genes *nir* realizado a través de técnicas de hibridación, técnicas basadas en PCR como PCR competitiva, MPN-PCR, PCR tiempo real, o micro arreglos. Se relevó una abundancia en el orden de los  $10^4$ - $10^9$  de copias de *nirS* por gramo de suelo, lo que fue subestimado por las técnicas de cultivo (Henry et al., 2006). A pesar de ello, el estudio de genes determinados por ADN solo indica un potencial desnitrificante ya que no se conoce la actividad de otros genes (Heylen, 2007).

Para el estudio de la variación de comunidades desnitrificantes se utilizan distintas técnicas de fingerprinting. Entre ellas la técnica de Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) que es una técnica llamada de "huella genética" basada en el análisis de polimorfismos del largo de fragmentos de restricción. Se utilizan para ello enzimas de restricción (presentes en microorganismos como parte del sistema de defensa) las cuales cortan el ADN en secuencias específicas. Por lo tanto la técnica consiste en someter determinado segmento de ADN (puede provenir de la amplificación de un gen *nirS*, *nirK*, ARNr 16S, etc.) a la acción de una o más enzimas de restricción. El tamaño de los fragmentos resultantes dependerá de la secuencia de ADN por lo que dos moléculas de ADN con distinta secuencia generarán distinto patrón de fragmentos de ADN que pueden visualizarse en un secuenciador capilar separándolos por electroforesis. (Travers, 2008). Se utiliza el primer forward marcado con un compuesto fluorescente de manera que el detector del secuenciador detecta el fragmento 5'.

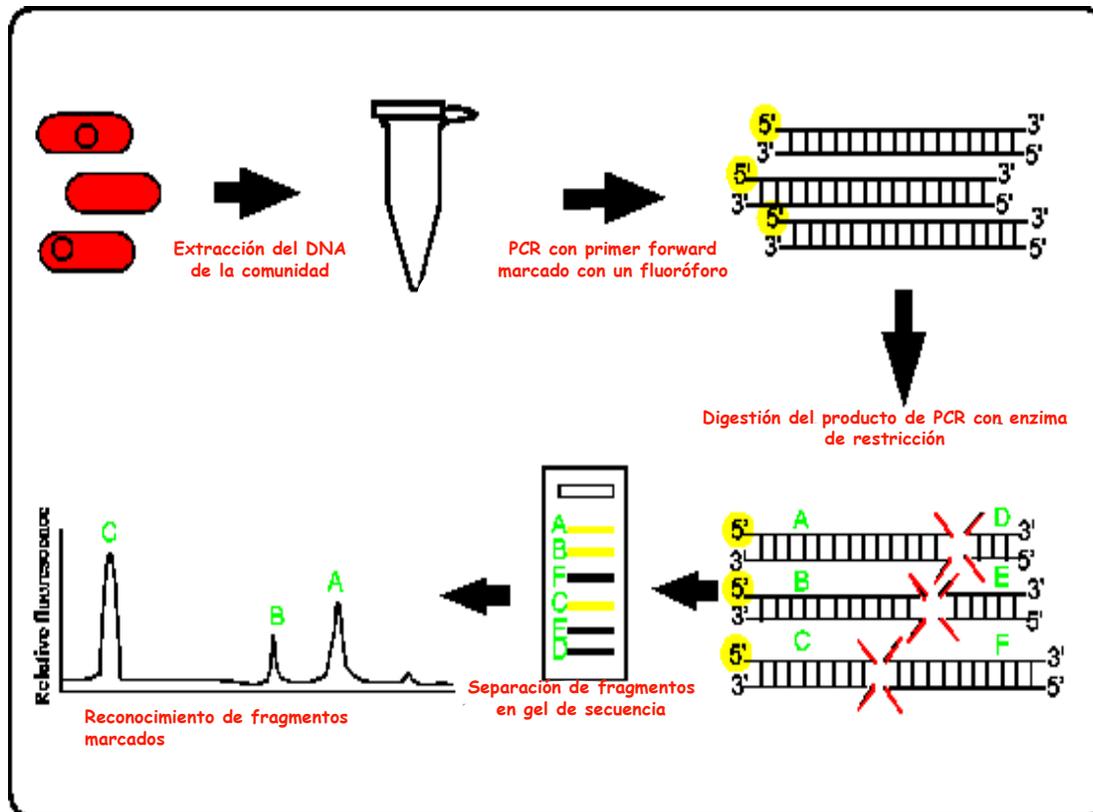


Figura 2: Esquema del protocolo para T-RFLP extraído de Cabezas (2005).

### **Criterios para determinar la capacidad de desnitrificar de microorganismos aislados.**

Los dos criterios existentes para definir si un microorganismo tiene la capacidad de realizar respiración desnitrificante son (i) producción de  $N_2O$  o  $N_2$  a partir de nitrato o nitrito y (ii) un balance de masa donde el crecimiento de las bacterias se correlacione con el consumo de nitrato o nitrito y la fuente de carbono (Heylen, 2007). En el trabajo de Mahne et al. (1995) se describen dos criterios para determinar bacterias desnitrificantes, i) la porción de la cantidad de  $N_2O$  formado a partir de nitrato o nitrito mayor al 80 % o ii) verificar la presencia de la nitrito, oxido nítrico u oxido nítrico reductasas. Otra característica de las bacterias desnitrificantes es la velocidad de desnitrificación específica, en el trabajo de Mahne et al. (1995) sugieren que las bacterias desnitrificantes tienen una velocidad de producción de gas mayor a  $10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de proteína.

## **Estudio del proceso de desnitrificación en diferentes ecosistemas**

Cuando la desnitrificación fue descubierta el primer ecosistema estudiado fue el suelo, ya que en la agricultura es el proceso responsable de la pérdida de nitrógeno, el nutriente limitante en la producción agrícola. El suelo es considerado una matriz tridimensional donde los nutrientes, las condiciones y la desnitrificación son variables a lo largo del tiempo y del espacio. En la rizósfera, grandes poblaciones de bacterias desnitrificantes pueden remover el nitrato y emitir  $N_2O$ . La pérdida de fertilizante comúnmente se encuentra en el rango de 20 a 30 %, como resultado de esto se utiliza más fertilizante que luego causa la contaminación de aguas superficiales y aguas subterráneas. El uso excesivo de fertilizantes, junto con la intensa actividad agrícola y la contribución de la industria han incrementado la carga de nitrógeno que reciben los cursos de aguas, disminuyendo la calidad del agua, contaminando y produciendo la eutrofización de los cursos de aguas y provocando problemas de salud (Heylen, 2007).

La forma más económica de remover el nitrógeno de los efluentes es mediante un proceso biológico. Debido a que generalmente en los efluentes el N se encuentra en forma de amonio (efluentes ricos en proteínas) se deben acoplar los procesos de nitrificación-desnitrificación para la remoción global del N en forma de gas. Estos dos procesos implican una primera etapa llevada a cabo por bacterias autótrofas donde el amonio es oxidado a nitrito por las bacterias oxidadoras de amonio y el nitrito formado es oxidado por las bacterias oxidadoras de nitrito a nitrato. Muchas bacterias heterótrofas facultativas pueden llevar a cabo la segunda etapa, la desnitrificación donde el nitrato es reducido a nitrógeno molecular utilizando sustratos contenidos en el efluente como dador de electrones. Las condiciones que favorecen cada uno de estas etapas son diferentes y pueden ser llevadas a cabo en un único reactor en diferentes tiempos o en reactores separados. La desnitrificación puede ser utilizada también para la eliminación de hidrocarburos contaminantes. Las bacterias desnitrificantes son capaces de degradar hidrocarburos como el BTEX compuesto por (Benzoato, Tolueno, Etilbenzeno y Xileno) que son los principales contaminantes en acuíferos, aguas y sedimentos debajo de los tanques de petróleo, en las refinerías, en los derrames, etc. (Heylen, 2007).

En la desnitrificación se produce  $N_2O$  que es el tercer gas que contribuye al efecto invernadero. Si bien sus efectos reactivos son menores al  $CO_2$ , el  $N_2O$  es 300 veces más

persistente en la atmósfera. La desnitrificación total (a  $N_2$ ) ya sea tanto como ocurre en la naturaleza o fomentada por el hombre contribuye a disminuir el efecto ozono y el efecto invernadero. Se ha detectado que las lombrices de tierra emiten  $N_2O$  y  $N_2$ . Esta emisión parece deberse a una desnitrificación que ocurre en el tracto digestivo de las mismas a partir del suelo que ingieren, este efecto podría contribuir considerablemente a la desnitrificación en el suelo (Heylen, 2007).

Además, la desnitrificación tiene un posible rol en la patogenicidad. La habilidad de respirar óxidos de nitrógeno confiere a ciertos patógenos la ventaja de adaptarse a la vida intracelular (Philippot et al., 2005).

## **SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES**

Los procesos industriales generan efluentes que al ser vertidos en cursos de agua producen diversos problemas para el medio ambiente. Como lo establece el Decreto 253/79 de la legislación uruguaya, se deben cumplir con determinados estándares que incluyen limitaciones en cuanto a la contaminación nitrogenada, ya que ésta puede provocar eutrofización de sistemas acuáticos e incluso puede generar toxicidad para el ser humano.

En la actualidad se realizan tratamientos para reducir la materia orgánica de los efluentes, la cual representa una importante fracción de los mismos. Habitualmente se realizan tratamientos de tipo primario donde se produce la remoción de material particulado, grasas, etc., principalmente por procesos fisicoquímicos y de tipo secundario donde el principal interés es la remoción de materia orgánica. Para este último se pueden utilizar sistemas de tratamiento biológico en condiciones anaerobias donde ocurre el proceso llamado metanogénesis, o sistemas de tratamiento biológico aerobios como el de los sistemas de lodos activados. En el caso del tratamiento de efluentes en sistemas metanogénicos la materia orgánica sufre una serie de procesos oxidativos en los que participan distintos grupos de bacterias y que culminan en la formación de  $CH_4$  y  $CO_2$ . Sin embargo, luego de esta etapa el efluente aún conserva nitrógeno principalmente bajo forma de amonio, debido principalmente a la degradación de proteínas. En los casos donde se utilizan sistemas aerobios del tipo de lodos activados, dependiendo de la carga inicial de N del influente, el amonio puede ser transformado en nitrito y nitrato por nitrificación o puede ser asimilado, lo

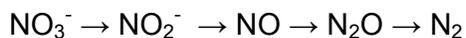
que implica que la carga nitrogenada permanecerá en el efluente o en la biomasa del lodo (Travers, 2008).

Actualmente se ha reconocido la necesidad de eliminar dicha contaminación. Para ello se han diseñado sistemas de tratamiento que combinan dos procesos microbiológicos: nitrificación (oxidación aerobia del amonio a nitrato) y desnitrificación (reducción del nitrato a  $N_2$  en condiciones anóxicas). Estos procesos ocurren en la naturaleza como parte del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Figura 1). Estos procesos pueden llevarse a cabo en reactores separados o en un solo reactor operado en dos fases (aerobia y anóxica).

Reacciones de la nitrificación:



Reacciones de la desnitrificación



Los llamados reactores en batch secuenciales (del inglés: Sequencing batch reactor, SBR) son reactores operados en batch bajo una serie de etapas que constituyen un ciclo. El ciclo consiste generalmente en periodos de llenado, reacción, sedimentación, extracción y fase inactiva (esta última se puede omitir). Esta operación permite que un reactor simple actúe como una serie de reactores secuenciales y un sedimentador. Durante el período de llenado el agua residual que ingresa es agregada a la biomasa del ciclo anterior que se encuentra en el tanque. La extensión del período de llenado depende del volumen del SBR y la naturaleza del efluente de donde provenga. El llenado es intermitente y el reactor puede o no ser agitado durante ese periodo. Luego en el periodo de reacción el reactor puede o no ser aireado dependiendo del objetivo del mismo. En esta etapa se produce la nitrificación es decir el pasaje de amonio a nitrato y nitrito posteriormente si se airea el reactor. Luego puede ocurrir una segunda reacción que es la desnitrificación en condiciones de anaerobiosis donde el nitrato formado pasa a nitrito, NO,  $N_2O$  y finalmente  $N_2$ . En la etapa de sedimentación puede ocurrir la desnitrificación u otros procesos anaerobios. Esta etapa consiste en la decantación del lodo hacia el fondo del reactor de modo de poder vaciar el reactor en la próxima para comenzar un nuevo ciclo. La última etapa recibe el nombre de purgado y consiste en el vaciado del efluente y el purgado del lodo excedente.

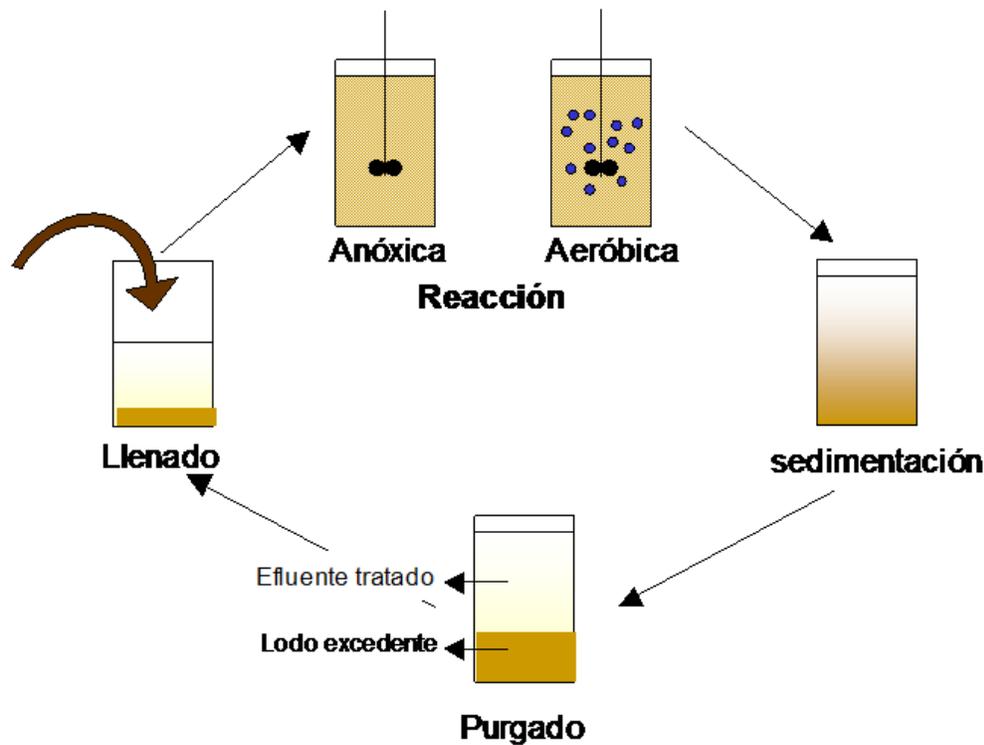


Figura 3: Etapas del ciclo de operación de un reactor SBR nitrificante-desnitrificante (Travers, 2008).

Las principales ventajas de estos reactores son los altos rendimientos de eliminación de nitrógeno, materia orgánica biodegradable, y la adaptabilidad a cambios en las condiciones de operación. Otra ventaja importante es que estos sistemas constan de un solo reactor donde ocurren las dos etapas (aerobia y anaerobia) disminuyendo los costos de inversión y mantenimiento.

Un requisito fundamental para estos sistemas de tratamiento de efluentes es que la biomasa quede retenida en el reactor de manera que no se pierda la biomasa activa del sistema y que el agua de salida presente una baja contaminación. Esto se logra con diversos sistemas de retención de células: formación de flóculos (reactores tipo lodos activados y SBR), formación de gránulos (reactores tipo UASB), adhesión a soporte (reactores de biofilm como por ejemplo lecho fluidizado, filtros biológicos) y en los últimos años se ha diseñado sistemas de membranas que impiden el pasaje de los microorganismos (reactores de membrana). La mayoría de estos sistemas se basan en la adhesión de las células a soportes inertes o en la auto-agregación formando los flóculos o gránulos. No sólo es necesario lograr la formación de gránulos o flóculos adecuados sino también lograr que éstos presenten una buena

capacidad de sedimentación. Si las células no sedimentan el lodo se “flota” y se produce pérdida de biomasa con una concomitante pérdida de eficiencia del sistema.

### **Problemas de sedimentación en reactores de tratamiento de efluentes**

Los problemas de mala sedimentación han sido ampliamente estudiados en sistemas aerobios del tipo de lodos activados. Estos problemas pueden ser causados por un exceso de bacterias filamentosas (bulking filamentoso) o a un exceso de exopolímeros producido por las bacterias formadores de flóculos (bulking viscoso) (Jenkins et al., 1993).

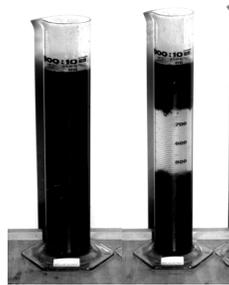


Figura 4: Muestra de un lodo de un sistema de tratamiento de efluentes de lodos activados con problemas de sedimentación. A la izquierda se muestra el lodo a tiempo cero y a la derecha se muestra el lodo media hora después. Se observa la flotación de la biomasa.

([www.jomueller.de/english/Desinteg3engl.html](http://www.jomueller.de/english/Desinteg3engl.html)).

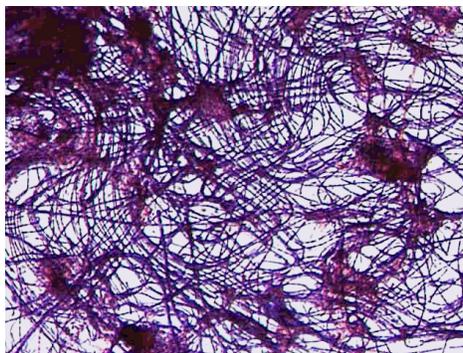


Figura 5: Microfotografía de un flóculo de una muestra de lodo de un sistema de lodos activados con problemas de bulking filamentoso.

([www.environmentalleverage.com/sludge\\_dewatering.htm](http://www.environmentalleverage.com/sludge_dewatering.htm)).

En sistemas de lodos activados el “bulking” filamentoso es uno de los principales problemas de operación y causa numerosas pérdidas económicas. Si bien este problema ha sido muy

estudiado aún no se conocen las causas que producen el sobrecrecimiento de las bacterias filamentosas (Martins et al., 2004). El problema se ha agravado con la utilización de sistemas mixtos aerobios-anóxicos como los sistemas de remoción de nitrógeno. Al parecer las condiciones de microaerofilia y de baja concentración de sustrato favorecen el sobrecrecimiento de las bacterias filamentosas (Martins et al., 2004). Aunque la mayoría de las bacterias filamentosas que producen problemas de sedimentación en sistemas aireados no pueden crecer en ausencia de oxígeno por lo que la mala sedimentación debe tener causas microbiológicas diferentes.

El “bulking” viscoso se ha asociado a la sobreproducción de exopolímeros celulares por algunas bacterias. Se ha reportado la producción de un tipo de exopolímero especial en una cepa desnitrificante del género *Thauera* que podría ser responsable de la producción de este tipo de problema de sedimentación (Allen et al., 2004).

Además de los problemas de sedimentación detectados en sistemas de lodos activados, también se han reportado problemas de flotación en lodos de reactores desnitrificantes anóxicos (Cuervo López et al., 2004, Etchebehere et al., 2002, Passeggi et al., 2004). Estos problemas se asocian con la presencia de bacterias desnitrificantes que producen exopolímeros con determinada composición química. Según los trabajos de Cuervo López y colaboradores (2004) el tipo de sustrato en la desnitrificación genera diferente composición proteica del exopolímero que afecta directamente la sedimentabilidad del lodo. Por otro lado el trabajo de Passeggi et al., (2004) atribuye estos problemas de flotación a la retención de burbujas de N<sub>2</sub> por los lodos.

Si bien estos problemas se detectan frecuentemente, se sabe poco aún de las causas microbiológicas que producen esta mala sedimentación y de qué parámetros se pueden modificar para evitar estos problemas. En particular no se conoce el tipo de microorganismos desnitrificantes involucrado en los problemas de Bulking y los factores que determinan el sobrecrecimiento de este tipo de microorganismos.

## **EXOPOLIMEROS - ExoP (EXTRACELULAR POLIMERIC SUBSTANCES)**

Los ExoP son productos del metabolismo que las células acumulan en su superficie (Morgan et al., 1990). Son el mayor componente de los flóculos y de biofilms que forman las células y

juegan un rol central en la formación de los diferentes tipos de biofilm, flóculos y gránulos (McSwain et al., 2004). Los ExoP están compuestos por una variedad de sustancias orgánicas. En cultivos puros los carbohidratos constituyen la sustancia predominante de los ExoP (Cescuitti et al., 1999), mientras que las proteínas son el mayor constituyente en los ExoP extraídos de muestras de lodos de reactores de tratamiento de efluentes (Frang et al., 1996) (Veiga et al., 1997).

La cuantificación de ExoP es fuertemente dependiente del método de extracción utilizado (Wingender et al., 1999), no existiendo un método estándar de extracción lo cual dificulta comparar los resultados con otros trabajos publicados (Herbert et al., 2002). Según Guiband et al. (2006) el protocolo usado para la extracción de los ExoP no solo afecta la cantidad sino también su composición y propiedades.

Existen métodos físicos y químicos para la extracción de los ExoP de la biomasa de lodos. Los métodos físicos consisten en una extracción mecánica lo cual explica la menor cantidad de ExoP que se obtienen con respecto a los métodos químicos. El tratamiento con ultrasonido genera una distorsión en el flóculo por un período de tiempo determinado donde los ExoP se vuelven solubles, al cabo de un tiempo se vuelven a formar los flóculos con una disminución en la proporción de ExoP extraídos. Por lo tanto es muy importante el tiempo en que se aplica este tratamiento. La extracción con calor se basa en que el calor genera una distorsión en el flóculo facilitando la extracción de los ExoP, pero las altas temperaturas pueden afectar también la naturaleza de los mismos. En las extracciones químicas la cantidad de compuestos carbonados totales extraídos depende fuertemente del método utilizado, este efecto no ocurre cuando se utilizan métodos físicos. Estudios realizados con infrarrojo (IR) demuestran que, cuando se utilizan métodos químicos, los ExoP pueden estar contaminados con los propios reactivos y esto podría afectar el comportamiento (Guiband et al., 2006).

Muchos investigadores plantean que la composición (Goodwin et al., 1985) y las propiedades de los ExoP (Liao et al., 2001) son más importantes que su cantidad en la floculación de lodos activados. Estos son esenciales para la formación del flóculo pero un exceso de los mismos genera un deterioro de la agrupación celular rompiendo la formación de la estructura del flóculo necesario para la buena separación del lodo y el efluente (Li et al., 2007).

En este trabajo se pretende abordar las causas microbiológicas, fisicoquímicas y bioquímicas que producen la mala sedimentación en lodos desnitrificantes de sistemas de tratamiento de efluentes.

## ANTECEDENTES

Desde hace varios años el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Cátedra de Microbiología ha trabajado en sistemas desnitrificantes de tratamiento de efluentes industriales. Se ha trabajado en varios proyectos en colaboración con el Departamento de Ingeniería de Reactores de la Facultad de Ingeniería. En estos proyectos se ha estudiado sistemas desnitrificantes UASB de laboratorio y sistemas SBR. El objetivo de estos trabajos fue buscar optimizar los sistemas para su posterior aplicación a escala real. Nuestro laboratorio se abocó al estudio de la microbiología de estos reactores mediante técnicas clásicas de cultivo y técnicas de biología molecular. Durante estos estudios se detectaron problemas de mala sedimentación en los sistemas desnitrificantes, esto fue reportado en publicaciones y presentaciones en Congresos (Etchebehere et al., 2002; Passeggi et al. 2004; Ferrari et al., 2005; Gutiérrez et al., 2006). Estos problemas afectaron la eficiencia de los sistemas por lo cual es de fundamental importancia detectar las causas y tratar de buscar soluciones. Por lo tanto se consideró necesario un estudio básico de los factores que afectan la capacidad de sedimentar. En esta tesis se analizaron muestras de dos de estos reactores que presentaron problemas de sedimentación (reactores M y F).

Desde el año 2003 en el laboratorio se realizó el estudio de la microbiología de un reactor de post-tratamiento de escala real de tipo SBR (Cabezas et al., 2009). Este reactor formaba parte del sistema de tratamiento de efluentes de una industria procesadora de cueros. Durante el estudio realizado por más de tres años, el reactor no presentó problemas de sedimentación. Las muestras de este reactor (reactor B) se tomaron para poder comparar sistemas con diferente capacidad de sedimentar.



# **OBJETIVOS**



## **OBJETIVO GENERAL**

Entender las causas de las diferentes propiedades de sedimentación de los lodos de sistemas de tratamiento biológico de efluentes de remoción de Nitrógeno y encontrar las condiciones necesarias para que los lodos presenten buenas propiedades de sedimentación.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar si existe una correlación entre la capacidad de sedimentar de un lodo desnitrificante y sus características físico-químicas (composición de exopolímeros, SSV y SST) y fisiológicas (velocidad de desnitrificación).
2. Determinar si la mala sedimentación de los lodos se debe a la presencia de un determinado grupo de microorganismos desnitrificantes.
3. Determinar las condiciones de cultivo que favorezcan la buena sedimentación de las bacterias aisladas.
4. Determinar si existe una relación entre la velocidad de desnitrificación y la capacidad de sedimentar de estos aislamientos.



## PREGUNTAS A RESPONDER

### Capítulo 1

#### **¿Existe una correlación entre la capacidad de sedimentar de un lodo desnitrificante y la naturaleza química de los exopolímeros?**

Para poder contestar esta pregunta se pondrán a punto técnicas de extracción de exopolímeros y se estudiará si existe una correlación entre la naturaleza química de los exopolímeros y las propiedades de sedimentación de los lodos.

#### **¿Existe una correlación entre la capacidad de sedimentar de un lodo desnitrificante y sus características físicas y químicas?**

Para responder la pregunta se comparará el IVL de los lodos con los sólidos suspendidos volátiles (SSV), sólidos suspendidos totales (SST). Se pretende determinar si hay alguna relación entre estos parámetros físico-químicos y las propiedades de sedimentación de los lodos.

#### **¿La velocidad de desnitrificación y el número de bacterias desnitrificantes influyen en la capacidad de sedimentar de los lodos?**

Se determinará la actividad específica de desnitrificación de las muestras de lodos de los tres reactores y el número de desnitrificantes mediante recuento por NMP se correlacionarán estos valores con los datos de sedimentación.

### Capítulo 2

#### **¿La mala sedimentación se debe a la presencia de un determinado grupo de microorganismo desnitrificante?**

Se estudiará la composición microbiana de los lodos desnitrificantes con diferentes capacidades de sedimentar, mediante la técnica T-RFLP del gen *nirS*. Se aislarán cepas desnitrificantes, se caracterizarán y se harán ensayos de sedimentación así como también se determinará la actividad desnitrificante de las cepas aisladas.

**¿Las cepas aisladas son representativas de la comunidad microbiana presentes en los reactores?**

Se analizará la comunidad microbiana con técnicas de biología molecular independientes del cultivo y se compararán los resultados con las cepas aisladas.

**Capítulo 3**

**¿Existe una relación entre la capacidad de agregación de los aislamientos y el comportamiento de sedimentación de los lodos de los reactores?**

Para responder esta pregunta se determinará la capacidad de agregación de las cepas aisladas de muestras de los diferentes reactores.

**¿Existen condiciones de crecimiento que favorecen la buena sedimentación?**

Se realizará el ensayo de agregación utilizando diferentes sustratos y diferentes concentraciones de nitrato.

**¿Hay una relación entre la capacidad de sedimentar y la velocidad de desnitrificar?**

Para contestar esta pregunta se determinará la velocidad específica de desnitrificación de cepas con buenas y malas propiedades de sedimentación.

# **CAPÍTULO 1**

***Estudio de las características de lodos con diferentes capacidades de sedimentación***



## OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

**1- Determinar si existe una correlación entre la capacidad de sedimentar de un lodo desnitrificante y la naturaleza química de los exopolímeros presentes en lodos de reactores con diferentes propiedades de sedimentación.**

Se puso a punto un método de extracción de los exopolímeros con lodos del reactor B y se estudió la naturaleza química de los exopolímeros de extraídos de las muestras de los tres reactores y las propiedades de sedimentación de la biomasa.

**2- Determinar la influencia de la velocidad de desnitrificación y el número de bacterias desnitrificantes en la capacidad de sedimentación de los lodos.**

Se logró determinar la actividad específica de desnitrificación en las muestras de lodos de los tres reactores analizados y el número de bacterias desnitrificantes mediante recuento por NMP. Se correlacionaron estos valores con los datos de sedimentación.

**3- Evaluar si existe una correlación entre la capacidad de sedimentar de un lodo desnitrificante y las características fisicoquímicas de la biomasa del reactor.**

Se logró una correlación entre los datos de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), de Sólidos Suspendidos Totales (SST) suministrados por los encargados de operación de los reactores y de IVL, con la capacidad de sedimentar.

## MÉTODOS

Se analizaron muestras de tres reactores cuyas características se describen en la Tabla 1. A partir del reactor M se tomaron 4 muestras: m01 (12/08/2005), m02 (24/08/2005), m03 (14/12/2005) y m04 (31/5/2006). Del reactor B se tomaron 4 muestras: b01 (10/2005), b02 (3/2005), b03 (4/2006) y b04 (5/2006) y del reactor F se tomó una única muestra f01 correspondiente a la fecha 31/05/2006.

**Tabla 1: Características de los reactores de los sistemas de tratamientos estudiados.**

REACTOR	TIPO	CICLO	ALIMENTACIÓN	COMPOSICIÓN DEL AFLUENTE
M	SBR-escala laboratorio para la remoción de carbono y nitrógeno.	2 ciclos de 12hs - llenado 30min - anoxia 1h - aireación 8h 30 min - sedimentación 1h - purga 30 min - vaciado 30 min	Agua residual sintética de la industria láctea preparado con leche diluida y nitrato de sodio	- N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 83 mg/L - N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 3.2 mg/L - N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 18 mg/L - DQO 1000 mg/L - Nitrógeno total Kiejdal 110 mg/L
F	SBR-escala laboratorio nitrificante – desnitrificante	2 ciclos de 12hs - llenado 30 min - anoxia 30 min - aireación 9h 30 min - sedimentación 1h - purga 15 min - vaciado 15 min	75 % de efluente de de la salida de una laguna de una industria láctea y 25 % leche diluida	- N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 80 mg/L - DQO 3000 mg/L - N total Kiejdal 60 mg/L
B	SBR escala real nitrificante desnitrificante	1 ciclo de 24 hs - llenado 8 hs - aireación 2hs - sedimentación 1h - descarga 13	Agua residual de una curtiembre pretratada anaeróbicamente.	- N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 28 kg/día - DQO 870 kg/día

Los datos de SSV y SST que se presentan en los resultados fueron suministrados por los encargados de operación de los reactores, estos parámetros fueron determinados de acuerdo a la técnica descrita en APHA, (1995). En las muestras del reactor B la empresa también suministró los datos de IVL.

Durante la operación de los reactores M y F se reportaron problemas de sedimentación, (Gutiérrez et al., 2006), mientras que para el reactor B no fueron detectados estos problemas (datos suministrados por el encargado de operación de la planta de tratamientos).

## **Extracción de Exopolímeros (ExoP) a partir de lodos**

Para optimizar la técnica de extracción de ExoP se probaron las siguientes condiciones:

### Variación de la Agitación y Temperatura

Se lavó el lodo con buffer de extracción (Buffer fosfato 50 mM, pH 6.8 suplementado con 0.9 g/L de NaCl). Se colocaron en un vial volúmenes iguales de lodo previamente lavado y de buffer de extracción. Se evaluaron las siguientes condiciones: tiempos de agitación 2 h y 18 h; temperaturas de incubación 25 °C, 57 °C y 100 °C y agitación orbital y magnética.

### Tratamiento con sonicación

Se colocó en baño de hielo un tubo Falcon con volúmenes iguales de muestra de lodo previamente lavado y de buffer de extracción. Se aplicaron tres condiciones diferentes de tratamiento con ultrasonido: (1)- pulsos de un segundo durante un minuto, (2)- pulsos de veinte segundos durante un minuto y (3)- dos pulsos de un minuto. Se realizó un cuarto ensayo usando las condiciones del punto (1) pero utilizando agua destilada en lugar de buffer de extracción. Se utilizó como testigo una extracción realizada sin tratamiento con ultrasonido, con agitación orbital y a temperatura ambiente.

## **Determinación de proteínas y carbohidratos en los exopolímeros extraídos**

Se determinaron las proteínas de los ExoP de los lodos, mediante el método de Lowry et al. (1951) (Anexo 1). Los carbohidratos se determinaron mediante la técnica de fenol-sulfúrico (Kochert, 1978) (Anexo 2).

Los ExoP del lodo B fueron extraídos mediante sonicación durante 1 minuto con pulsos de 1 segundo y Amplitud 20 %. El material resultante fue liofilizado, resuspendido en agua destilada y utilizado para determinación de los azúcares reductores (utilizando método del DNS). Esta solución se usó también para la determinación de carbohidratos y proteínas utilizando el método del BCA (Protein Assay Reagent).

## **Gel filtración de los ExoP del lodo B**

Se resuspendió 75 mg del liofilizado del extracto del lodo del reactor B en 1,5 mL de agua destilada y se aplicó un volumen de 0.5 mL de dicha solución a una columna comercial NAP-5 (Sephadex G-25). Se recogió una primera fracción de 1 mL (F1) y 2 fracciones adicionales

de 0.5 mL cada una (F2 y F3). Sobre cada fracción se determinaron proteínas y carbohidratos utilizando el método del BCA.

### **Obtención del perfil de bandas proteicas de los EXoPolímeros mediante electroforesis**

Las muestras de exopolímeros extraídas con la técnica física que involucra la sonicación fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y reductoras utilizando geles homogéneos (PhastGel 7.5) y geles con gradiente (PhastGel Gradient 4-15). Las corridas se realizaron en equipo PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia) según las especificaciones del fabricante.

Las muestras a analizar fueron pretratadas de la siguiente forma: 25  $\mu$ L de la muestra se mezclaron con 25  $\mu$ L de sample buffer (buffer 10mM Tris/HCl pH 8.0, suplementado con 1 mM EDTA, 2 % SDS y 10% glicerol), 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y 1  $\mu$ L de azul de bromofenol. La mezcla se calentó durante 5 minutos en baño de agua a ebullición. Se dejó enfriar y se utilizó para el análisis. En la corrida electroforética se incluyeron estándares de peso molecular (14,4 – 97,0 KDa, Pharmacia). Los geles se revelaron mediante tinción con plata, siguiendo una secuencia de pasos indicados por el fabricante.

### **Determinación de la actividad desnitrificante de los lodos**

Para eliminar restos de efluente la muestra de lodo se lavó con el buffer de extracción y se concentró a la mitad del volumen inicial. Se gaseó con una corriente de Nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto. Se colocaron 16 mL de la muestra de lodo en un vial previamente gaseado con nitrógeno, se agregó 2 mL 40 mM de Acetato de potasio y 2 mL 20 mM de Nitrato de potasio. Se procedió por duplicado y a cada vial se incubó a temperatura ambiente con agitación en un agitador orbital a una velocidad de 250 rpm. Se sacaron alícuotas de entre 600-800  $\mu$ L cada 20 minutos. Se determinó la concentración de nitratos y nitritos por HPLC (Shimadzu), con columna de intercambio iónico (IC pack anión) y detector UV. Como fase móvil se utilizó buffer fosfato (5mM, pH 6.8). Se graficó la cantidad de Nitrato consumida en función del tiempo y de la pendiente se calculó la actividad desnitrificante por gramo de sólido suspendido volátil (SSV) determinado en la muestra.

### **Recuento de bacterias desnitrificantes por número más probable (NMP)**

Se realizó el recuento por NMP de bacterias desnitrificantes sembrando por triplicado, cuatro diluciones de cada muestra en viales con 10 mL con medio mineral BCY (Quevedo et. al, 1996, Anexo 5) con solución 18.7 mM de acetato de potasio y 7.1 mM de nitrato de potasio y atmósfera de Nitrógeno. Los viales fueron incubados a 37 °C sin agitación hasta que se observó que no había cambio en el número de viales positivos. Se tomó como positivos aquellos viales con crecimiento y cambio de color del indicador (resazurina). La ausencia de nitrito y nitrato se verificó en aquellos tubos positivos utilizando el EM QUANT Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) test (MERCK).

### **Determinación del índice volumétrico de lodos (IVL).**

Se colocó un volumen de 100 mL de muestra de lodo en una probeta de 100 mL de capacidad. Se dejó sedimentar durante 30 minutos y se midió el volumen ocupado por el lodo en la probeta (APHA, 1995).

El IVL se calculó con la siguiente ecuación:

$IVL = SV \text{ (mL)} / SS \text{ (mg/L)}$ , donde el SV es el volumen del lodo ocupado en la probeta luego de la sedimentación y SS es la concentración de los sólidos suspendidos

## **RESULTADOS**

### **Puesta a punto de la extracción de ExoP de lodos**

Para optimizar las condiciones de extracción de los ExoP se utilizaron muestras del Lodo del reactor B y se probaron diferentes condiciones de temperatura, agitación y relación muestra/buffer. Se evaluó la influencia de estas condiciones, determinando la concentración de los carbohidratos extraídos.

**Tabla 2: Efectos de la Temperatura y la Agitación en la extracción de los ExoP del lodo B.**

Ensayo	temperatura (°C)	método físico	tiempo	carbohidratos (µg/mL)
1	57	Agitación orbital	2 hs	53
	100			175
	25			0
2	25	Agitación orbital	2hs	6
		Agitación magnética		0
3	25	Agitación orbital	2hs	6
			18 hs	1
	25	Agitación magnética	2 hs	0
			18 hs	1

\* Los carbohidratos fueron determinados por métodos del Fenol-sulfúrico (Anexo 2)

En la tabla 2 se observa que al aumentar la temperatura se incrementó la concentración de carbohidratos extraídos lo que podría ser atribuido a cierta lisis celular provocada por la alta temperatura.

En cuanto al tipo de agitación no se puede concluir que un método de agitación es mejor que otro ya que las diferencias de concentración de los carbohidratos son muy pequeñas. Lo mismo ocurre cuando se varía la relación buffer muestra lodo.

Se evaluó el efecto de la sonicación en la extracción de los ExoP y se determinó la concentración de las proteínas y los carbohidratos extraídos.

**Tabla 3: Comparación de diferentes condiciones de extracción usando tratamiento por sonicación.**

Ensayo	Solvente para extracción	pulsos (seg)	tiempo (minutos)	Carbohidratos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	Agua	1	1	28	67
B	Agua	20	1	19	57
C	Agua	60	2	36	104
D*	Agua	0	0	1	29

\* Ensayo D: ensayo testigo utilizando agitación orbital durante 12 horas a temperatura ambiente. Los carbohidratos fueron determinados con el método fenol-sulfúrico y las proteínas fueron determinadas utilizando método de Lowry.

En la Tabla 3 se muestra la concentración de carbohidratos y proteínas presentes en los ExoP extraídos mediante los diferentes tratamientos de sonicación. Se puede observar que con el tratamiento C (dos pulsos de un minuto cada uno) se incrementa la concentración de proteínas respecto a los demás tratamientos lo que sugiere que este tratamiento podría provocar la lisis celular.

Para evaluar el efecto del solvente en la extracción, se repitió las condiciones del ensayo A y se incluyó una extracción con buffer, en las mismas condiciones indicadas (Tabla 4).

**Tabla 4: Comparación de extracción de ExoP usando diferentes solventes**

Ensayo	Solvente para extracción	pulsos (seg)	tiempo (minutos)	Carbohidratos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )
E	Buffer	1	1	20	48
F	Agua	1	1	19	62

En la tabla se indican las condiciones y las características de los ExoP extraídos del lodo B luego de ser conservado a 4 °C durante 48 horas. Los carbohidratos fueron determinados con el método fenol-sulfúrico y las proteínas fueron determinadas utilizando método de Lowry.

Se observa que en las condiciones utilizadas, no hay diferencias apreciables entre usar agua destilada y buffer, para la extracción.

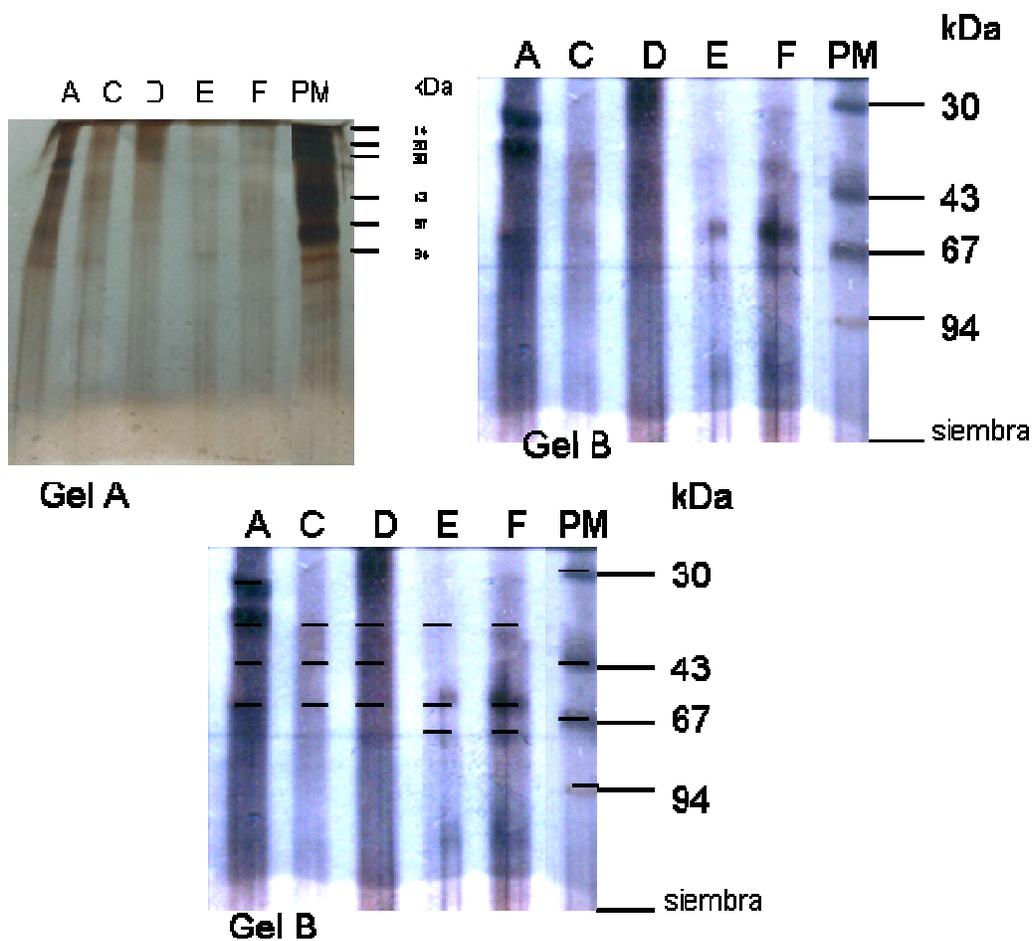


Figura 6: Perfiles de SDS-PAGE en geles con gradiente 4-15% (Gel A) y homogéneos 7.5 (Gel B). De izquierda a derecha en ambos geles: Muestras correspondientes a los ensayos A, C, D, E y F mediante sonicación. PM estándares de peso molecular. Tinción con plata.

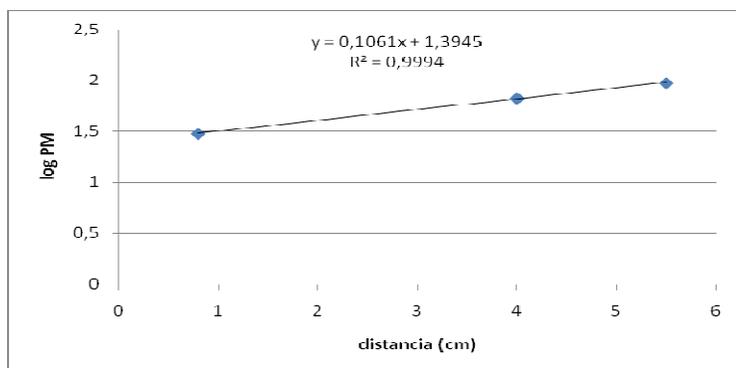


Figura 7: Curva de calibración para los PM en función de la distancia recorrida en Gel B.

En la figura 6 se pueden observar los ensayos A, C, D, E, F en ambos geles; con gradiente a la izquierda (gel A) y homogéneo a la derecha (gel B) y en la figura 7 se muestra la curva de calibración utilizada para el cálculo de los pesos moleculares de las bandas proteicas de las corridas.

De ambas corridas electroforéticas se pueden hacer las siguientes observaciones:

- Los pesos moleculares de las bandas reveladas por tinción con plata se agrupan en la zona de pesos moleculares bajos, por lo que el gel homogéneo 7.5 discrimina mejor las bandas respecto al perfil obtenido en el gel con el gradiente 4-15.
- En el gel con gradiente se pueden observar que las bandas presentes en el carril D (ensayo testigo) no son resueltas tan claramente como se observa en el gel homogéneo 7.5.
- En el carril E se observa mejor en el gel homogéneo 7.5, en el cual se puede observar una banda de 60 kDa, otra de 73 kDa y una tercera banda de 38 kDa pero de mucho menor intensidad.
- En el carril F nuevamente el gel homogéneo resuelve mejor las bandas que el gel con gradiente.
- En el gel homogéneo los carriles A y C presentan perfiles semejantes, si bien una banda claramente indicada en A (30 kDa) no es visible en C.
- Comparando C y D se observa la misma distribución de bandas: una de 38 kDa, otra de 43 kDa, y una tercera de 60 kDa.
- Comparando E y F, se observa el mismo patrón de bandas, siendo únicamente la banda de 30 kDa más intensa en F.
- La extracción usando buffer (E) presenta un perfil electroforético similar que cuando se usó agua destilada para extraer los ExoP (F).
- El perfil A y F, si bien se trata del mismo lodo y las condiciones de extracción son las mismas, la variante entre A y F es el tiempo de conservación de la muestra previo a la extracción, se observan perfiles de electroforesis diferentes.

En la extracción utilizada como testigo (D) no se extrajeron cantidades apreciables de carbohidratos y la concentración de proteínas en los ExoP fue muy baja.

## Composición química de los expolímeros extraídos de los lodos

Se realizó la extracción de ExoP con ultrasonido utilizando el tratamiento F para las tres muestras de lodos en estudio (M, F y B). Se estudió su composición química (carbohidratos y proteínas) y el perfil electroforético de las proteínas.

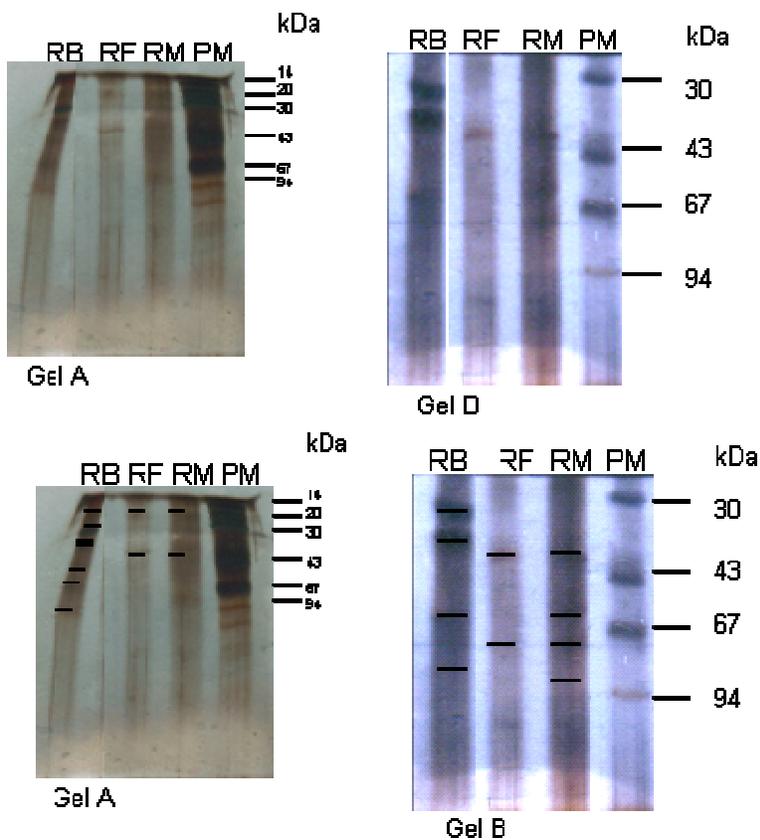


Figura 8: Perfiles de SDS-PAGE en geles con gradiente 4-15 (gel A) y homogéneos 7.5 (gel B). De izquierda a derecha: Muestras de los ExoP extraídos de los lodos de los reactores B, F y M y el marcador de peso molecular. Tinción con plata.

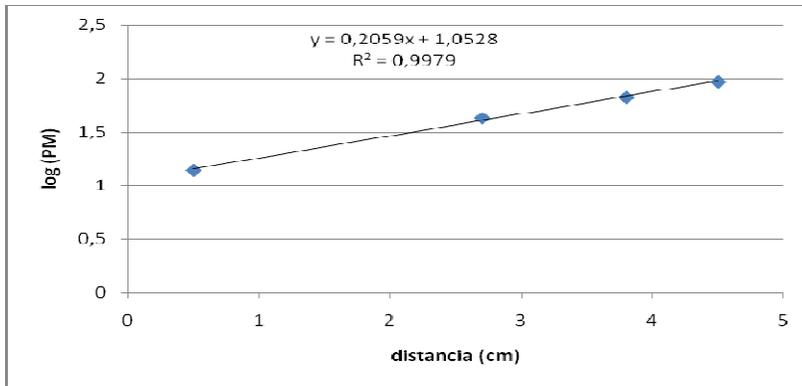


Figura 9: Curva de calibración para los PM en función de la distancia recorrida en el gel con gradiente 4-15.

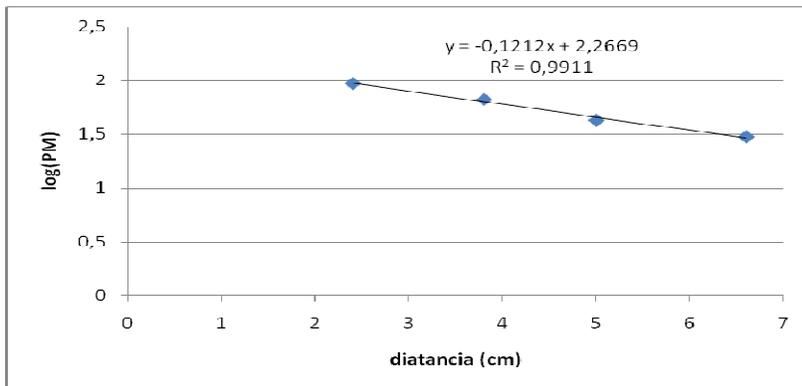


Figura 10: Curva de calibración para los PM en función de la distancia recorrida en el gel homogéneo 7,5.

- RF y RM tiene un perfil de bandas similares en el gel A. Sin embargo en el gel B se puede ver una banda de 85 kDa en el carril RM que no está presente en el lodo del reactor F (carril RF).
- En el gel A en el ExoP del lodo del reactor B (carril RB) se pueden observar tres bandas en 46, 69 y 110 kDa. Estas bandas no parecen estar presentes en las muestras de los ExoP de los lodos de los reactores F y M (carriles RF y RM respectivamente).
- En el gel B la banda correspondiente a 30 kDa está bien definida en el ExoP del lodo del reactor B (RB). Esta banda no se observa en los lodos F (RF) ni M (RM).

El perfil electroforético para los tres lodos es diferente. Estos perfiles de bandas corresponden a pesos moleculares de las subunidades proteicas, dado que se trata de una

electroforesis desnaturalizante y en condiciones reductoras, por lo que las corridas corresponden a las cadenas polipeptídicas individuales.

**Tabla 5: Determinación de Carbohidratos, proteínas y de la relación P/C, (relación proteínas carbohidratos) de los ExoP extraídos con el tratamiento A mediante ultrasonido.**

reactor	Carbohidratos		Proteínas		P/C
	µg/mL	mg/g lodo	µg/mL	mg/g lodo	
M	34	10	58	16	1.6
F	14	11	94	75	6.8
B	20	78	18	69	0.8

En la Tabla 5 se observa que el lodo del reactor F presenta una relación P/C mayor que los restantes lodos y que el lodo del reactor B, que no presenta problemas de sedimentación, tiene el menor valor de P/C.

El material extraído del reactor B (liofilizado) fue resuspendido en agua y se realizó la reacción de reductores con DNS, no obteniéndose lectura a 540 nm. Sobre esa misma muestra se realizó método del BCA, obteniéndose un valor de 158 µg/mL. Debido a que el método se basa en una reacción de reductores, este valor no puede asignarse totalmente a proteínas de la muestra.

### **Gel filtración**

Se realizó un experimento adicional en el cual la solución del lodo B se gel filtró en columna de NAP-5 (Sephadex G-25). Usualmente estas columnas están diseñadas para desalado de muestras proteicas, de forma que las proteínas eluyen en el volumen muerto de dicha columna (identificada en el experimento como F1). En la primera fracción eluyen los componentes con pesos moleculares mayores a 7000 Da (límite de exclusión para el Sephadex G-25). Se decidió luego sacar 2 fracciones adicionales, de forma de recuperar aquellos componentes del lodo de pesos moleculares menores a 7000 Da. Así, la F1 contiene proteínas y carbohidratos de pesos moleculares mayores de 7000 Da en tanto que en F2 y F3, se puede asumir que contienen mayoritariamente polipéptidos y oligosacáridos menores a 7000 Da.

**Tabla 6: Resultados obtenidos mediante método del BCA en las tres fracciones recogidas de la columna de gel filtración.**

	BCA ( $\mu\text{g/mL}$ )
SOLUCION (50 mg/mL)	158
FRACCIÓN 1	50
FRACCIÓN 2	37
FRACCIÓN 3	27

A partir de los datos de la Tabla 6 se pueden realizar los siguientes cálculos:

$$50 \mu\text{g (F1)} + 18 \mu\text{g (F2)} + 13 \mu\text{g (F3)} = 81 \mu\text{g}$$

ELUIDO

Se sembró 79  $\mu\text{g}$

El término de % en peso, el 63 % corresponde a carbohidratos reductores y proteínas (en conjunto) de pesos moleculares mayores a 7000 Da y un 39 % corresponde a carbohidratos reductores y/o polipéptidos con pesos moleculares inferiores a 7000 Da.

#### **Actividad desnitrificante y recuento por NMP de bacterias desnitrificantes de los lodos**

Se evaluó la actividad desnitrificante y el número de bacterias desnitrificantes por el método de número más probable de las muestras de lodos de los tres reactores en estudio (Tabla 7). Se observa que los valores de actividad desnitrificante de las muestras del reactor B que no presentó problemas de sedimentación, fueron menores que los valores de las actividades tanto de las muestras del reactor F como del reactor M.

**Tabla 7: Recuento por NMP de bacterias desnitrificantes, actividad desnitrificante y SSV de los lodos estudiados en muestras tomadas en diferentes fechas.**

REACTOR	MUESTRA	ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE		RECUESTO NMP DE DESNITRIFICANTES		
		ACTIVIDAD (mgNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /h*g SSV)	desv st	NMP/g de SSV	LIMITE DE CONF. 95% inferior	LIMITE DE CONF. 95% superior
M	m01	10,19	0,77	1,72E+08	3,43E+07	5,03E+08
M	m02	7,1	0,12	1,11E+09	2,23E+08	3,27E+09
M	m03	13,5	0,09	4,81E+10	8,97E+09	1,47E+11
M	m04	20,55	0,47	2,40E+08	4,00E+07	5,38E+08
F	f01	14,39	0,03	2,94E+09	4,53E+08	1,53E+10
B	b01	1,63	0,05	6,15E+08	1,03E+08	3,08E+09
B	b02	5,71	0,21	1,97E+08	3,26E+07	1,10E+09
B	b03	1,58	0,04	7,62E+08	1,14E+08	4,13E+09
B	b04	3,33	0,01	1,80E+08	1,41E+07	5,10E+08

Los valores de recuento de bacterias desnitrificantes en la mayoría de las muestras del reactor B también fueron inferiores a los valores obtenidos para las muestras de los reactores F y M. Este método presenta una incertidumbre muy grande lo cual dificulta comparar los valores.

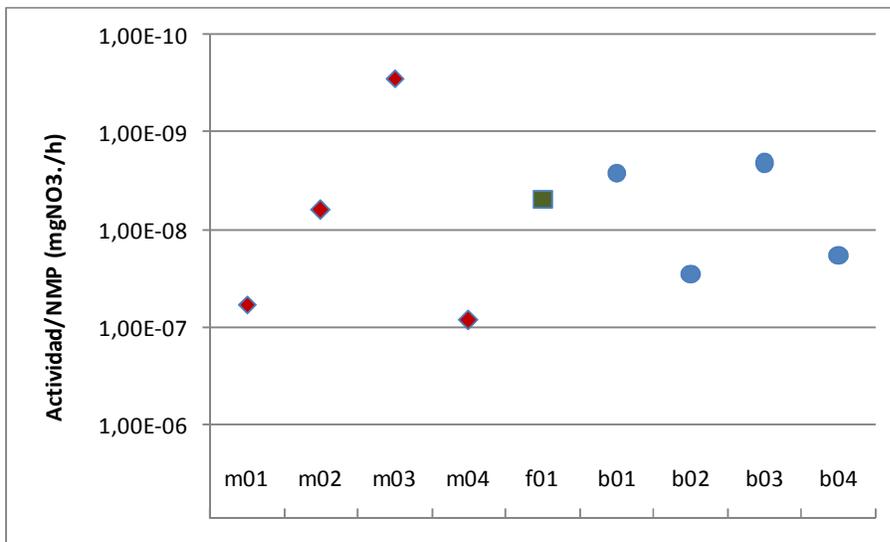


Figura 11: Valores de Actividad desnitrificante (mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/h\*gSSV)/NMP/gSSV de las diferentes muestras estudiadas de reactores los M, F y B.

## Relación de SSV (sólidos suspendidos volátiles)-SST (sólidos suspendidos totales) en los lodos

La relación SSV/SST da una idea de la relación entre la biomasa y los sólidos inorgánicos. Según los datos suministrados de SSV y SST de muestras tomadas a lo largo del tiempo de los tres reactores en estudio, se observa que la relación SSV/SST a lo largo del tiempo se mantuvo constante. Sin embargo el valor promedio para el lodo del reactor escala real (reactor B) es menor que el de los lodos de reactores de laboratorio que presentaban problemas de sedimentación.

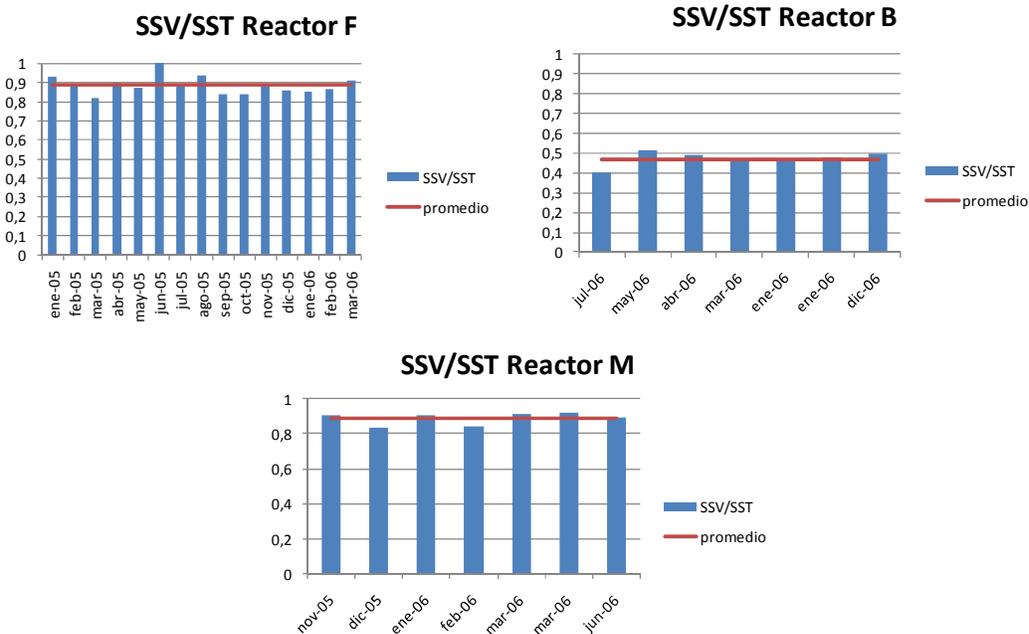


Figura 12: Relación SSV/SST de los reactores M, B y F a lo largo del tiempo.

Tabla 8: Relación promedio SSV/SST de los tres sistemas de tratamiento estudiados y sus respectivas desviaciones estándar.

Reactor	SSV/SST promedio	desviación estándar
F	0,89	0,05
M	0,89	0,03
B	0,47	0,04

## IVL (índice volumétrico del lodo) DE LOS LODOS

Tabla 9: IVL de los lodos en muestras tomadas de los reactores en diferente fechas.

REACTOR	MUESTRA	IVL
F	f01	64
M	m03	363
M	m04	104
B	b03	168*
B	b04	142*

\* Los datos de IVL de las muestras del reactor B fueron proporcionadas por el encargado de la planta de tratamiento).

En los resultados de IVL de las diferentes muestras de los lodos se observó valores mayores para las muestras de los reactores M y B (Tabla 9). Se observó una gran variación en los datos de IVL de las muestras del reactor M. Para el reactor F solo se pudo analizar una única muestra.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos con las técnicas ensayadas para la optimización de la extracción de exopolímeros presentes en los lodos el tratamiento más apropiado es la sonicación durante 1 minuto con pulsos de 1 segundo (y amplitud 20 %) usando buffer de extracción. Las técnicas de extracción utilizando sólo agitación no resultan tan eficientes ya que los niveles de proteínas y carbohidratos fueron muy bajos. Con respecto al tratamiento con mayor temperatura, si bien se mejoró la extracción, la alta temperatura podría provocar la lisis celular, con lo cual se estarían extrayendo tanto ExoP como componentes intracelulares.

La sonicación y la agitación muestran el mismo perfil de bandas. Ello podría atribuirse a que las condiciones de sonicación usadas son suficientes para provocar dispersión o disgregación de los ExoP y pero no suficientes para provocar la lisis celular.

Las proteínas de los ExoP de los tres lodos presentan perfiles electroforéticos diferentes indicando diferente composición proteica de los mismos aunque con una distribución de bandas con pesos moleculares en el entorno de 20-70 KDa.

Asimismo, se observa que la relación proteínas/ carbohidratos (P/C) en los lodos que presentan flotación es mayor que 1 mientras que en el lodo del reactor B que no presenta problemas de sedimentación este valor es menor a 1. Estos resultados concuerdan con los reportados por Cuervo-López et al. (2004), quienes observaron que al aumentar la relación P/C aumenta la flotación. En nuestro trabajo se obtuvieron valores de P/C mayores para los lodos M y F que presentaron problemas de flotación. Estos resultados confirman la hipótesis de que la relación de proteínas y carbohidratos de los EPS podría ser un factor importante en el comportamiento de los lodos en cuanto a la flotación. Según el trabajo de Cuervo-López et al. (1999) la relación P/C de los ExoP resulta ser un mejor indicador de la estabilidad de los reactores, que el IVL.

Se observó también que los reactores con problemas de sedimentación presentaron valores mayores de actividad desnitrificante por lo que podría asociarse los problemas de sedimentación al proceso de desnitrificación. El aumento de la velocidad de desnitrificación puede ser debido a una mayor proporción de bacterias desnitrificantes en los lodos de los reactores. Para el lodo del reactor M la actividad desnitrificante fue de 7 a 20 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/h\*g de SSV, el recuento de bacterias desnitrificantes fue entre 10<sup>8</sup>- 10<sup>10</sup> NMP/g de SSV y para el lodo del reactor B los valores de actividad se encuentran entre 1 y 5 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/h\*g SSV y el recuento de bacterias desnitrificantes en el orden de 10<sup>8</sup> NMP/g de SSV. Sin embargo, la actividad calculada por célula (actividad/NMP de bacterias desnitrificantes no presentó grandes diferencias en los diferentes lodos. Esto indicaría que el aumento de actividad total del lodo se debe a una mayor proporción de células con capacidad de desnitrificar y no a la presencia de organismos con mayor velocidad de desnitrificación.

Puede observarse que el lodo B con características de buena sedimentación presentó una relación de SSV/SST menor que los lodos (M y F) y que esta relación se mantuvo constante en los tres lodos a lo largo del tiempo. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de Beer et al. (1996) donde el agregado de carbonato de calcio aumenta la densidad de los gránulos sedimentando gránulos que en otras condiciones flotaban.

Los valores de IVL para obtener buenas propiedades de sedimentación son muy discutidos ya que varios autores proponen diferentes rangos óptimos de IVL (Lippel et al., 2007). Para el IWPC (The Institute of Water Pollution Control) un valor óptimo sería de un

IVL menor a 180 (Schmidell et al., 2007). Si tomamos este valor como valor de referencia el lodo del reactor B tendría un IVL óptimo para la sedimentación. Sin embargo, los valores de IVL de los lodos de los reactores M y F no son representativos del comportamiento del lodo. Esta diferencia se puede deber a que el ensayo se realizó con 100 mL de lodo, esto se debe a que M y F son reactores a escala de laboratorio siendo imposible retirar un volumen mayor de lodo para realizar el ensayo.

## **CONCLUSIONES**

El método de extracción de exopolímeros utilizando un tratamiento con ultrasonido durante 1 minuto con pulsos de 1 segundo y una amplitud del 20 % resulta adecuado para la extracción de los mismos a partir de los lodos estudiados en este trabajo.

La electroforesis realizada en condiciones desnaturizantes y reductoras y usando geles homogéneos 7.5 permite generar mejores perfiles de bandas de las diferentes proteínas presentes en los ExoP extraídos de los lodos.

La relación proteínas - carbohidratos (P/C) de los ExoP extraídos de los lodos influye sobre las propiedades de sedimentación. Una relación alta de P/C parece estar asociada a una mala sedimentación de los lodos.

Los lodos de reactores con problemas de sedimentación presentan mayor número de bacterias desnitrificantes. Una mayor proporción de bacterias desnitrificantes genera mayor actividad desnitrificante específica. El aumento de la formación de gas  $N_2$  llevaría a una mayor retención de burbujas por la biomasa y por lo tanto a una mayor flotación de los lodos.

Los lodos con mayor capacidad de sedimentar tiene menor relación SSV/SST.

# **CAPÍTULO 2**

*Aislamiento y caracterización de las cepas desnitrificantes predominantes en la biomasa de reactores con diferente capacidad de sedimentar*



## OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### **1- Determinar cuál es el mejor método para aislar bacterias desnitrificantes de las muestras de lodos de reactores.**

Se analizaron dos muestras del reactor B utilizando 15 estrategias diferentes de aislamiento y se determinó el valor de Fitness descrito en el trabajo de Heylen et al, 2006 para cada uno de ellos. Basados en estos resultados se determinó cual sería el mejor método de aislamiento de cepas desnitrificantes.

### **2- Determinar si la mala sedimentación de los lodos se debe a la presencia de un determinado grupo filogenético de microorganismos desnitrificantes.**

Con el método de aislamiento que resultó más adecuado se aislaron cepas desnitrificantes de muestras de los tres reactores en estudio. Las cepas se caracterizaron por métodos clásicos y de biología molecular.

### **3- Determinar si las cepas aisladas son representativas de la comunidad microbiana desnitrificante presente en los reactores**

Se analizó la comunidad microbiana de muestras del reactor B con técnicas de biología molecular independientes de cultivo. Se correlacionó los resultados obtenidos con los aislamientos.

## MÉTODOS

### **Optimización de técnicas de aislamiento de cepas desnitrificantes**

#### ***Métodos de aislamiento***

Se ensayaron 15 estrategias de aislamiento utilizando diferentes medios de cultivo, condiciones de incubación y técnicas de aislamiento (tabla 10).

Este estudio se realizó con dos muestras del reactor B (muestras tomados los días 09/2006 y 12/2006). Los aislamientos se realizaron en placa y se aislaron las colonias que presentaron diferente morfología macroscópica.

**Tabla 10: Diferentes estrategias utilizadas para optimizar el aislamiento de cepas desnitrificantes.**

Método	Estrategia	Medio solido para aislamiento	Atmósfera de incubación
A	Aislamiento a partir de la mayor dilución del NMP <sub>A</sub> de desnitrificantes	TSA (Tryptone soy agar)	Aerobio
B	Aislamiento directo	Agar con sobrenadante del lodo filtrado por membrana 0,45 micras	Aerobio
C	Aislamiento directo	Agar con sobrenadante del lodo esterilizado por autoclave	Aerobio
D	Aislamiento directo	Agar con lodo esterilizado por autoclave en el centro (figura13)	Aerobio
E	Aislamiento a partir del recuento en placa en el medio TSA	TSA (Tryptone soy agar)	Aerobio
F	Aislamiento directo	TSA (Tryptone soy agar)	Aerobio
G	Aislamiento directo	Medio mineral con acetato (18,7 mM) y nitrato (7,1 mM)	Aerobio
H	Aislamiento directo	Medio mineral con acetato (18,7 mM) y nitrato (7,1 mM)	Anaerobio
I	Aislamiento directo	Medio mineral con acetato (6,1 mM), succinato (6,1 mM), etanol (6,1mM) y nitrato (7,1 mM)	Aerobio
J	Aislamiento a partir de la mayor dilución del NMP <sub>M</sub> de desnitrificantes	TSA (Tryptone soy agar)	Aerobio
K	Aislamiento a partir de la mayor dilución del NMP <sub>A</sub> de desnitrificantes	Medio mineral con acetato (18,7 mM) y nitrato (7,1 mM)	Aerobio
L	Aislamiento directo	Agar con influente filtrado por membrana 0,45 micras	Aerobio
M	Aislamiento directo	Agar con sobrenadante del lodo filtrado por membrana 0,45 micras	Anaerobio
N	Aislamiento directo	Medio mineral con acetato (6,1 mM), succinato (6,1 mM), etanol (6,1mM) y nitrato (7,1 mM)	Anaerobio
O	Aislamiento directo	Agar con influente filtrado por membrana 0,45 micras	Anaerobio

NMP<sub>A</sub>: NMP de desnitrificantes con medio BCY, NMP<sub>M</sub>: número más probable de desnitrificantes con medio BCY modificado, fuente de carbono: Acetato (6.1 mM), Succinato (6.1 mM) y Etanol (6.1 mM) en lugar de solo acetato y Nitrato (7.1 mM).

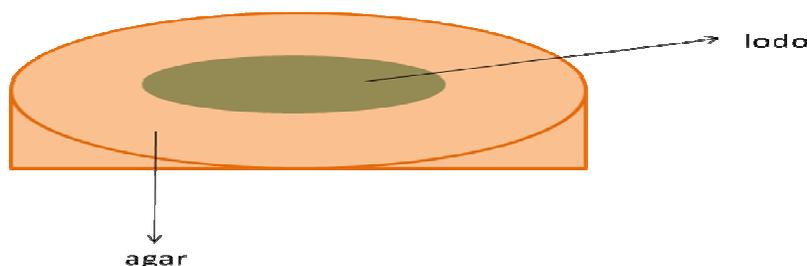


Figura 13: Esquema de la estrategia que utiliza como medio de cultivo agar con lodo autoclavado en el centro de la placa.

### ***Caracterización de las cepas aisladas***

Se realizó la caracterización de las cepas mediante el análisis de perfil de restricción del gen del ARNr 16S (Amplified rDNA Restriction Analysis, ARDRA). Los perfiles de restricción se agruparon utilizando el programa Gelcompare (Biomath) (protocolo anexo 6). La extracción de ADN se realizó mediante lisis alcalina (anexo 7).

Se determinó la secuencia del gen del ARNr 16S de una cepa representativa de cada perfil, para ello se realizó la extracción de ADN usando el Kit Genomic purification Kit (Promega) según las instrucciones del fabricante. Se amplificó el gen del ARNr 16S como se describió y el producto se purificó con el Kit comercial QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN).

Las secuencias se determinaron por el servicio brindado por Macrogen (Corea) y se compararon con secuencias depositadas en el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -SEARCH. El género de cada cepa se determinó de acuerdo al porcentaje de similitud en el BLAST-SEARCH (se consideraron como pertenecientes a un género las cepas cuya secuencia presentaron más de 97 % de similitud con secuencias de ese género).

### ***Determinación de la capacidad de desnitrificación de los aislamientos mediante consumo de nitrato y nitrito***

Para establecer cuáles de las cepas aisladas tenían la capacidad de desnitrificar se cultivaron las cepas en medio BCY (con acetato y nitrato) y se determinó si la cepa consumía el Nitrato presente en el medio y si además consumía el Nitrito producido.

Para ello se inocularon viales con 10 mL de medio mineral BCY, con un inóculo proveniente de un cultivo fresco de las cepas a estudiar. Los viales se incubaron a 37 °C hasta observar viraje del indicador (resazurina) y se confirmó la ausencia de Nitrato y Nitrito utilizando el test EM QUANT Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) test (MERCK).

Como forma de verificar la capacidad de desnitrificar, se verificó la presencia del gen de la enzima clave de la desnitrificación (nitrito reductasa). Para ello se amplificó el gen de la enzima nitrito reductasa (*nirS* o *nirK*) por PCR según (Braker et al., 1998) (secuencias de los primers en anexo 8 y protocolo en anexo 9).

### ***Evaluación de los diferentes métodos de aislamiento***

Para evaluar la eficacia de los diferentes métodos de aislamiento, se determinó el Valor de Fitness (F) para cada método según (Heylen et al., 2006).

$$F = R \times \text{Índice de diversidad de Simpson}$$

$$R = \frac{\text{Número de aislamientos desnitrificantes}}{\text{Número de aislamientos}}$$

**Número de aislamientos**

El Índice de diversidad de Simpson se calculó usando el programa estadístico PAST (Hammer et al., 2006). Para este cálculo sólo se tuvieron en cuenta las cepas que presentaron desnitrificación. Se utilizó el perfil de ARDRA como indicador de diferentes especies.

### **Aislamiento y caracterización de las cepas obtenidas a partir de las diferentes muestras de lodos**

Se aislaron cepas de los reactores F, M y B a partir de las placas del recuento en TSA y de los tubos positivos del recuento por NMP de desnitrificantes con acetato como fuente de carbono. Se estudiaron 4 muestras del reactor M: (2/08/2005, 24/08/2005, 14/12/2005 y 31/5/2006, 2 muestras del lodo del reactor F (f02 (día de operación 419) y f03 (día de operación 446)), y del lodo del reactor B se estudiaron 14 muestras distribuidas en tres años (mayo/2004, setiembre/2004, diciembre/2004, enero/2005, marzo/2005, mayo/2005, octubre/2005, diciembre/2005, enero/2006, abril/2006, mayo/2006, julio/2006, setiembre/2006 y diciembre/2006).

Se seleccionaron aquellas cepas que consumieron el nitrato y el nitrito determinado por el test EM QUANT Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) test (MERCK) al crecer en el medio BCY (con acetato y nitrato).

Se determinó el perfil de ARDRA y se secuenció el gen del ARNr 16S de una cepa representativa de cada perfil con el método ya descrito. La capacidad de desnitrificar de los aislamientos se verificó realizando el ensayo de crecimiento en medio BCY con nitrato y acetato midiendo el  $\text{N}_2\text{O}$  acumulado luego del agregado de acetileno como se describe a continuación.

Se verificó la presencia del gen de la enzima nitrito reductasa (*nirS* o *nirK*) por PCR según (Braker et al., 1998) (secuencia de los primers en anexo 8 y protocolo en anexo 9).

### **Determinación de la capacidad desnitrificante de las cepas mediante la técnica de bloqueo por acetileno**

Para establecer cuáles de las cepas aisladas de las muestras de los tres reactores tenían la capacidad de desnitrificar se cultivaron las cepas en medio desnitrificante y se determinó la proporción de  $\text{N}_2\text{O}$  producido luego del agregado de acetileno (Mahne et al., 1995).

Para ello se inocularon viales con 10 mL de medio mineral BCY con acetato y nitrato, con un inóculo proveniente de un cultivo fresco de las cepas a estudiar. Para inhibir el último paso de la desnitrificación ( $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) se agregó un volumen de acetileno igual al 10% del volumen del head space del vial. Los viales se incubaron a 37 °C hasta observar viraje del indicador redox (resazurina). Se determinó la acumulación de  $\text{N}_2\text{O}$  mediante cromatografía gaseosa utilizando un GC (Shimadzu), con columna porapack Q y detector de captura electrónica (Shimadzu). Al final del ensayo se confirmó la ausencia de nitrato y nitrito utilizando el test EM QUANT Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) test (MERCK).

Se calculó el porcentaje de nitrato que formó  $\text{N}_2\text{O}$ , y se utilizó el criterio establecido por (Mahne et al., 1995) considerando que las cepas que desnitrifican transforman más del 80 % del nitrato en  $\text{N}_2\text{O}$ . Se utilizó este criterio como definición de cepa desnitrificante.

### **Análisis de las secuencias de clones de una biblioteca del gen del ARNr 16S**

En un trabajo anexo a esta tesis se realizó una biblioteca de clones del gen del ARNr 16S en el laboratorio del Center for Microbial Ecology de la Michigan State University de una muestra de lodo del reactor B (octubre/2005). En esta tesis se realizó el análisis de las secuencias y su comparación con las secuencias obtenidas a partir de los aislamientos.

El gen ARNr 16S fue amplificado usando los primer 27 forward y 1492 reverse según (Etchebere et al, 2001). El producto de PCR fue concentrado por rotaevaporación y purificado por electroforesis usando QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN)

Para el clonado se utilizó el kit TOPO TA cloning kit for sequence (Invitrogene) siguiendo el protocolo del fabricante. Las colonias fueron repicadas al azar y las secuencias del inserto fueron determinadas utilizando el primer forward del gen clonado con el secuenciador ABI Prism 3700 en MSU Genomics Technology and Support Facility.

Las secuencias de los clones fueron comparadas con secuencias depositadas en el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -SEARCH. Cada OTU (Operational taxonomic unit) fue definida como aquella secuencia con más de un 97 % de similitud con la secuencia depositada en el BLAST. Las secuencias representativas de cada OTU fueron alineadas con secuencias del NCBI y se construyó el árbol filogenético utilizando el programa MEGA versión 3.1 (Kumar et al., 2004).

### **T-RFLP del gen del ARNr 16S en muestras de lodos**

Para determinar la abundancia relativa de los aislamientos en las muestras de lodos, se realizó el estudio de la comunidad bacteriana mediante el T-RFLP del gen del ARNr 16S en las muestras del reactor B utilizadas para optimizar la técnica de aislamiento de bacterias desnitrificantes.

Para ello se realizó la extracción de ADN de las muestras de lodo utilizando el DNA purification kit for soil (MoBio) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se amplificó el gen del ARNr 16S utilizando los primers 27 forward marcado con el fluoróforo 6-FAM (5'-[6]-carboxy-fluorescein) y el primer 1492 reverso (Anexo 8) de acuerdo a lo

especificado en (Braker et al., 2001). El producto de PCR fue purificado utilizando el QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN).

Se realizó la digestión con dos enzimas de restricción *HhaI* y *MspI* (Fermentas) en forma independiente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La purificación de los fragmentos se efectuó con columnas Microcon 100 (Amicon). Los fragmentos fueron separados por electroforesis en el secuenciador automático (ABI Prism, 377) del Centro técnico de análisis genéticos, Facultad de Ciencias, UDELAR (CTAG). Para las corridas se utilizó en estándar interno TAMRA 2500 (Applied Biosystem) (Anexo 10).

Para evitar artefactos no se tomaron en cuenta picos menores de 50 nucleótidos ni mayores de 500. Se construyó una matriz de tamaños de fragmentos (T-RFs) y abundancia relativa que se calculó de acuerdo a la intensidad relativa de los picos. Los cromatogramas se estandarizaron al cromatograma de menor intensidad utilizando la corrección de Dunbar et al., 2001.

En estos análisis se consideraron solo los picos con una abundancia relativa mayor al 2%.

### **Estudio de la diversidad de bacterias desnitrificantes mediante T-RFLP *nirS***

Se realizó el análisis de la comunidad microbiana desnitrificante mediante T-RFLP del gen que codifica a la nitrito reductasa (*nirS*) de acuerdo a la técnica descrita por Braker al, (1998), utilizando los primers *nirS* 1F (secuencia de los primers en anexo 8) y *nirS* 6R específicos para el gen *nirS* también descritos en el trabajo. La extracción de ADN de las muestras de lodos se realizó utilizando el kit UltraClean Soil DNA, MoBio. Para la amplificación del gen por PCR se utilizó el primer forward marcado con 5'-6-carboxyfluoresceína de acuerdo a lo descrito por Braker et al., 2001. El producto de PCR se purificó a partir de la banda del gel de agarosa mediante el kit Qiaquick Gel Extraction kit de Qiagen.

Se realizó la digestión con dos enzimas de restricción *HhaI* y *MspI* (Fermentas) en forma independiente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La purificación de los fragmentos se efectuó con columnas Microcon 100 (Amicon). Los fragmentos fueron separados por electroforesis en el secuenciador automático (ABI Prism, 377) del Centro técnico de análisis genéticos, Facultad de Ciencias, UDELAR (CTAG). Para las corridas se utilizó en estándar interno TAMRA 2500 (Applied Biosystem). Protocolo anexo 11.

## RESULTADOS

### Optimización de las técnicas de aislamiento de cepas desnitrificantes

Se aislaron 54 cepas con las 15 estrategias diferentes que se agruparon en 21 perfiles de ARDRA. Se seleccionaron cepas representativas de cada perfil y se determinó la secuencia del gen ARNr 16S, que se comparó con secuencias del banco de datos (NCBI). Los resultados se muestran en la tabla 11.

La reducción de nitrato y nitrito fue determinado por consumo de nitrato y nitrito en cultivos en medio BCY (con acetato y nitrato). La presencia de *nirS* mediante reacción de PCR y el género de acuerdo a la secuencia del gen del ARNr 16S.

Las 54 cepas aisladas se agruparon en 21 perfiles de ARDRA diferentes y fueron caracterizadas dentro de 16 géneros (Tabla 11, Figura 14).

Género	Estrategias														
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	N	O	
<i>Acidovorax</i>					desnitrificante			desnitrificante							
<i>Aeromonas</i>	no desnitrificante	no desnitrificante									no desnitrificante				
<i>Bacillus</i>					no desnitrificante	no desnitrificante		no desnitrificante							
<i>Brachymonas</i>	desnitrificante														
<i>Chryseobacterium</i>					no desnitrificante										
<i>Comamonas</i>		desnitrificante													
<i>Enterobacter</i>	no desnitrificante	no desnitrificante		no desnitrificante					no desnitrificante						
<i>Gordonia</i>							no desnitrificante								
<i>Hidrogenophaga</i>	desnitrificante				desnitrificante	desnitrificante	desnitrificante		desnitrificante						
<i>Micrococcus</i>												no desnitrificante			
<i>Mycobacterium</i>													desnitrificante		
<i>Paracoccus</i>		desnitrificante	desnitrificante			desnitrificante			desnitrificante						
<i>Pseudomonas</i>	desnitrificante	desnitrificante			desnitrificante					desnitrificante				desnitrificante	
<i>Shinella</i>									desnitrificante						
<i>Stenotrophomonas</i>									no determinado				no determinado		
<i>Trichococcus</i>					desnitrificante	desnitrificante									

Figura 14: Géneros de las cepas aisladas con las diferentes estrategias estudiadas. Los géneros se determinaron de acuerdo a la secuencia del gen del ARNr 16S.

**Tabla 11: Cepas aisladas con cada estrategia y características de las mismas.**

cepa	Método	Reducción NO3 <sup>-</sup> /NO2 <sup>-</sup>	nirS	perfil de ARDRA	género
103	A	+	+	4	<i>Hydrogenophaga</i>
118, 142	A	+	+	8	<i>Pseudomonas</i>
111	A	-	-	9	<i>Aeromonas</i>
143	A	-	-	10	<i>Enterobacter</i>
104	A	+	+	17	<i>Brachymonas</i>
102	B	-	-	3	nd
137	B	+	+	6	<i>Paracoccus</i>
156	B	+	+	7	<i>Paracoccus</i>
146	B	+	+	8	<i>Pseudomonas</i>
100	B	-	-	9	<i>Aeromonas</i>
148, 149	B	-	-	10	<i>Enterobacter</i>
101	B	+	-	16	<i>Comamonas</i>
136	B	+	+	20	<i>Pseudomonas</i>
113	C	+	+	7	<i>Paracoccus</i>
114, 115, 116, 117	D	-	-	10	<i>Enterobacter</i>
92	E	+	+	4	<i>Hydrogenophaga</i>
96	E	+	+	5	<i>Acidovorax</i>
124, 126	E	+	+	8	<i>Pseudomonas</i>
94	E	-	-	11	<i>Bacillus</i>
121	E	-	-	11	<i>Bacillus</i>
93	E	+	+	12	<i>Trichococcus</i>
119	E	-	nd	13	nd
120	E	-	-	19	<i>Chyseeobacterium</i>
127, 128	F	+	+	4	<i>Hydrogenophaga</i>
130	F	+	+	6	<i>Paracoccus</i>
97, 129	F	-	-	11	<i>Bacillus</i>
98, 99	F	+	+	12	<i>Trichococcus</i>
157	G	+	+	4	<i>Hydrogenophaga</i>
160	G	-	-	21	<i>Gordonia</i>
131	H	+	+	5	<i>Acidovorax</i>
132	H	-	-	11	<i>Bacillus</i>
158	I	+	+	2	<i>Shinella</i>
135	I	+	+	4	<i>Hydrogenophaga</i>
133	I	+	+	7	<i>Paracoccus</i>
134	I	-	-	10	<i>Enterobacter</i>
140, 141	J	+	+	8	<i>Pseudomonas</i>
106, 107, 109	K	-	-	9	<i>Aeromonas</i>
108	K	-	nd	18	nd
138	L	-	-	1	<i>Micrococcus</i>
153	N	+	+	14	<i>Mycobacterium</i>
154	N	nd	-	15	<i>Stenotrophomonas</i>
162	O	+	+	8	<i>Pseudomonas</i>

**Tabla 12: Resultados del estudio de la optimización de las estrategias utilizadas para aislar bacterias desnitrificantes.**

estrategia	R	Nº géneros desnitrificantes	Fitness
A	0,67	3	0,52
B	0,56	3	0,39
C	1,00	1	0
D	0,00	0	0
E	0,56	4	0,5
F	0,71	3	0,52
G	0,50	1	0,25
H	0,50	1	0,25
I	0,75	3	0,56
J	1,00	1	0
K	0,00	0	0
L	0,00	0	0
M	0,00	0	0
N	0,50	1	0
O	1,00	1	0

R (número de bacterias desnitrificantes/ número de aislamientos totales)

F = R x Índice de diversidad de Simpson



Figura 15: La foto muestra la placa de medio utilizada en la estrategia M luego de ser incubada a 37 °C.

Se observó que con algunos métodos se aislaron cepas de diferentes géneros (métodos A, B, E, F, G, H, I) mientras que con otros todas las cepas aisladas pertenecieron al mismo género (C, D, J, K, L, N, O) (Figura 14).

No se aisló ninguna cepa utilizando el método M (aislamiento directo en placa con Agar con sobrenadante del lodo filtrado por membrana 0,45 micras) ya que las bacterias que ahí crecieron consumieron el agar no siendo posible el aislamiento (Figura 15).

Los valores de Fitness ( $F = R \times \text{Índice de diversidad de Simpson}$ ) que se muestran en la tabla 12 indican que el método I ( $F = 0,56$ ) presentó el mayor valor, pero los métodos F ( $F = 0,52$ ), A ( $F = 0,52$ ) y E ( $F = 0,5$ ) presentaron valores muy cercanos al máximo (Tabla 12, Figura 14).

### **Aislamiento y caracterización de cepas desnitrificantes a partir de muestras de los lodos B, M y F**

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió utilizar como método de aislamiento los métodos E y A que implican aislamiento a partir de las placas del recuento en TSA y a partir de los tubos positivos del recuento por NMP de desnitrificantes con acetato como sustrato. En ambos procedimientos el aislamiento se realizó en placas de TSA. Con estos métodos se aislaron 63 cepas de muestras de lodos de los tres reactores en estudio (F, M y B). Se consideraron las cepas desnitrificantes del reactor B aisladas en la optimización de estrategias de aislamiento.

Del reactor M se aislaron 10 cepas que se agruparon en 6 perfiles de ARDRA diferentes. De acuerdo a la secuencia del gen del ARNr 16S estas cepas se caracterizaron como pertenecientes a los géneros *Thauera*, *Azonexus*, *Shinella* y *Brachymonas* (Tabla13).

**Tabla 13: Cepas aisladas de muestras de los lodos de los reactores B, F y M.**

Cepa	aislada del reactor	Perfil de ARDRA	Género	Cantidad de aislamientos
B 20	B	5	<i>Paracoccus</i>	14
B 36	B	6	<i>Pseudomonas</i>	12
B 63	B	11	<i>Thauera</i>	2
B 66	B	8	<i>Paracoccus</i>	1
B 72	B	13	<i>Thauera</i>	1
B 92	B	2	<i>Hydrogenophaga</i>	6
B 96	B	3	<i>Acidovorax</i>	2
B 99	B	7	<i>Trichococcus</i>	3
B101	B	9	<i>Comamonas</i>	1
B104	B	10	<i>Brachymonas</i>	3
B136	B	12	<i>Pseudomonas</i>	1
B137	B	4	<i>Paracoccus</i>	2
B158	B	1	*	1
F10	F	Nd	<i>Bacillus</i>	1
F25	F	Nd	<i>Bacillus</i>	1
F26	F	Nd	<i>Ochrobactrum</i>	1
F27	F	Nd	Nd	1
M 01	M	B	<i>Thauera</i>	2
M 02	M	A	<i>Azonexus</i>	2
M 05	M	D	<i>Brachymonas</i>	2
M 08	M	C	<i>Shinella</i>	2
M 10	M	E	Nd	1
M 15	M	F	Nd	1

Nd= no determinado.\* La cepa 158 pertenece a los *Rizobiales*, no fue posible con la secuencia obtenida determinar el género.

De la muestra del reactor F se aislaron 4 cepas que se caracterizaron como pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Ochrobactrum* (tabla 13). Uno de los aislamientos (F27) no se pudo caracterizar ya que la calidad de la secuencia no fue buena.

		<i>Acidovorax</i>	<i>Brachymonas</i>	<i>Hidrogenophaga</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Thauera</i>	<i>Trichococcus</i>
		fechas						
	ene-05							
	mar-05							
	may-05							
	oct-05							
	dic-05							
	ene-06							
	abr-06							
	may-06							
	jul-06							
	sep-06							
	dic-06							

Figura 16: Géneros de cepas desnitrificantes aisladas en las diferentes muestras del lodo del reactor B, utilizando únicamente las estrategias A y E.

Se aislaron 49 cepas de muestras del reactor B que presentaron 13 perfiles de ARDRA diferentes. Estas cepas se caracterizaron como pertenecientes a los géneros: *Thauera*, *Acidovorax*, *Paracoccus*, *Hidrogenophaga*, *Trichococcus*, *Comamonas*, *Pseudomonas* y *Brachymonas*, de acuerdo a la secuencia del gen del ARNr 16S (tabla 13).

		<i>Acidovorax</i>	<i>Azonexus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Brachymonas</i>	<i>Hidrogenophaga</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Shinella</i>	<i>Thauera</i>	<i>Trichococcus</i>
		REACTORES										
	B											
	F											
	M											

Figura 17: Géneros de las bacterias desnitrificantes aislados en cada uno de los lodos de tres reactores utilizando las estrategias A y E.

En la figura 17 se puede observar que no hay cepas pertenecientes a un mismo género que se haya aislado en los tres reactores. Cepas pertenecientes a los géneros

*Brachymonas* y *Thauera* se aislaron tanto del reactor B como del M. Cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Ochrobactrum* solo se aislaron del reactor F.

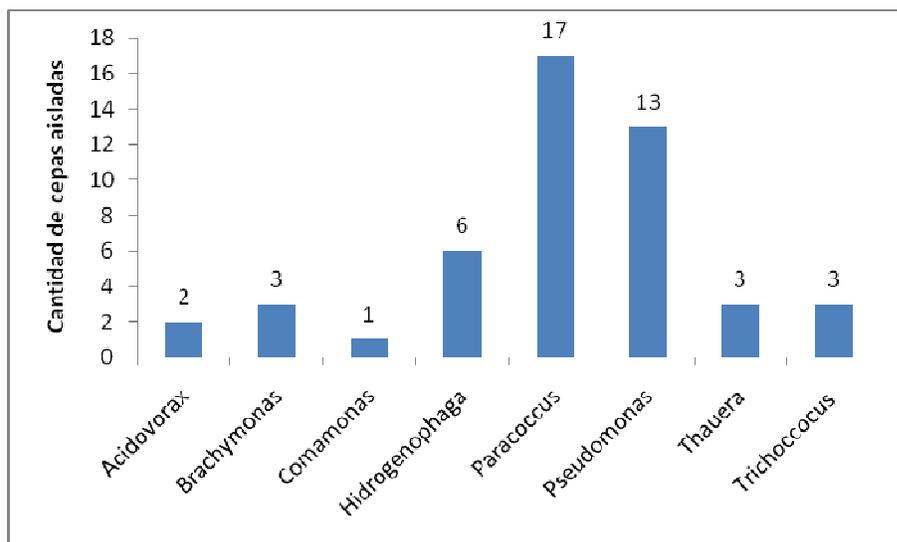


Figura 18: Cantidad de cepas desnitrificantes del lodo del Reactor B aisladas a lo largo del tiempo y su caracterización de acuerdo a la secuencia del gen del ARNr 16S (las cepas se agruparon por género al cual pertenecen).

Del grafico de la figura 18, se puede observar que existe una gran abundancia de cepas pertenecientes a los géneros *Paracoccus* y *Pseudomonas* dentro de los aislamientos de muestras del reactor B.

Cepas pertenecientes al género *Paracoccus* fueron aisladas en 7 de las 11 muestras analizadas del reactor B, indicando la persistencia de esta cepa en el reactor.

La Tabla 14 muestra los resultados del test de desnitrificación realizado por la técnica de bloqueo por acetileno (acumulación de  $N_2O$ ). Solamente dos de las cepas testadas (cepa B92, y cepa F25) no acumularon más del 80 % de  $N_2O$  según el criterio de Mahne et al. (1995) para definir la desnitrificación.

**Tabla 14: Cepas aisladas de los lodos de los reactores B, F y M.**

<b>Cepa</b>	<b>NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>% N<sub>2</sub>O</b>	<b>nirS</b>	<b>Género</b>	<b>perfil</b>
B 36	+	nd	+	<i>Pseudomonas</i>	6
B 62	+	87	Nd	<i>Paracoccus</i>	5
B 63	+	100	+	<i>Thauera</i>	11
B 66	+	100	+	<i>Paracoccus</i>	8
B 72	+	nd	+	<i>Thauera</i>	13
B 92	+	4	+	<i>Hydrogenophaga</i>	2
B 96	+	80	+	<i>Acidovorax</i>	3
B 99	+	nd	+	<i>Trichococcus</i>	7
B101	+	100	-	<i>Comamonas</i>	9
B104	+	100	+	<i>Brachymonas</i>	10
B136	+	94	+	<i>Pseudomonas</i>	12
B158	+	81	+	nd	1
F10	+	100	+	<i>Bacillus</i>	nd
F25	+	17	+	<i>Bacillus</i>	nd
F26	+	92	-	<i>Ochrobactrum</i>	nd
F27	+	100	+	nd	nd
M 01	+	88	+	<i>Thauera</i>	B
M 02	+	93	+	<i>Azonexus</i>	A
M 05	+	74	+	<i>Brachymonas</i>	D
M 08	+	73	-	<i>Shinella</i>	C
M 10	+	86	+	nd	E
M 11	+	92	-	<i>Shinella</i>	C
M 12	+	100	-	<i>Azonexus</i>	A
M 13	+	82	+	<i>Thauera</i>	B
M 15	+	87	+	nd	E
M 17	+	87	+	<i>Brachymonas</i>	D

nd: no determinado

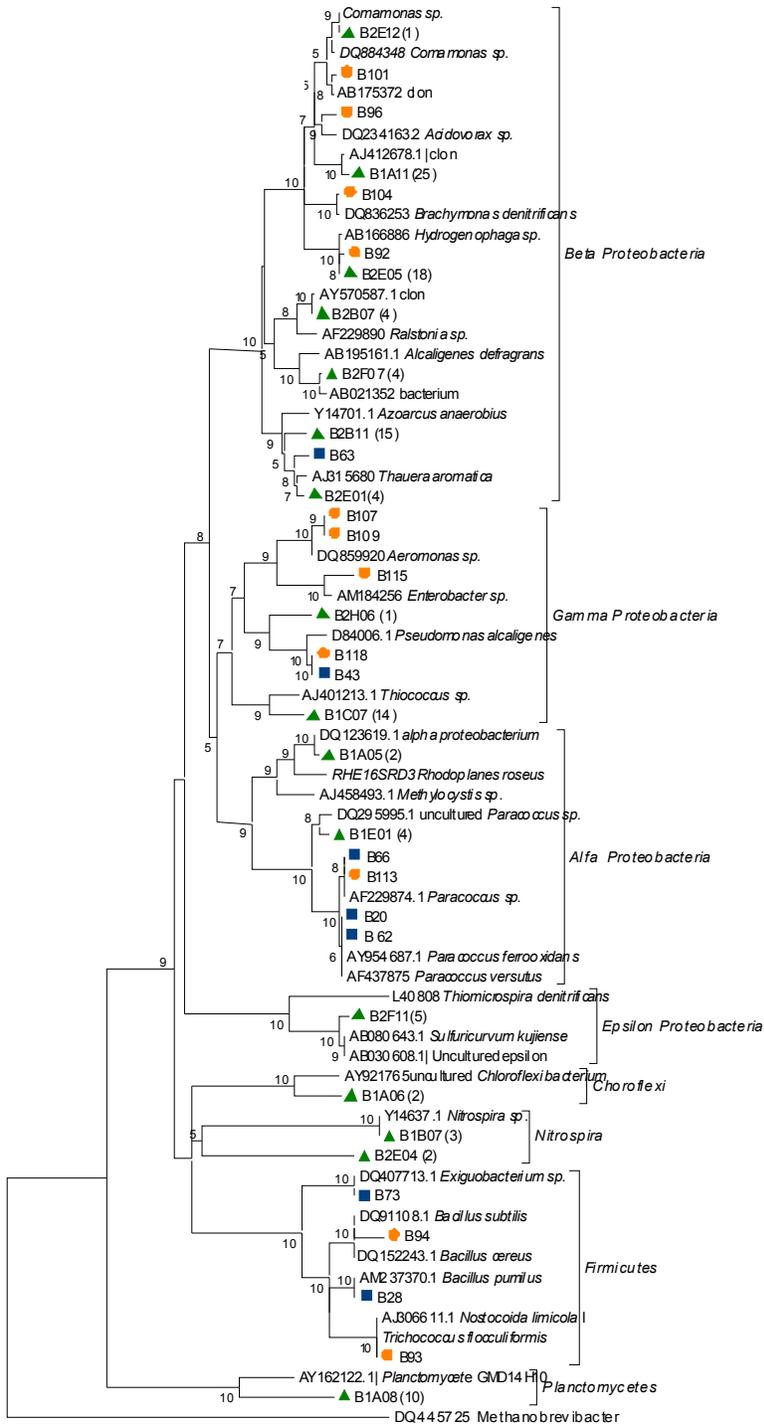
Se calculó la desviación estándar de los valores de % de N<sub>2</sub>O acumulado mediante el análisis de duplicados. Se observó una desviación estándar máxima del 8 %.

Para detectar cual de los genes de la nitrito reductasa estaba presente en las cepas, se amplificó por PCR el gen de la nitrito reductasa (*nirS* o *nirK*). Se observa que la mayoría de las cepas dio resultado positivo en la reacción de PCR para el gen *nirS*. La detección del gen *nirK* mediante PCR resultó positiva para las cepas M08, M11 y F26. Indicando una alta predominancia del gen *nirS* en los aislamientos.

### **Análisis de las secuencias de clones de una librería del gen del ARNr 16S**

Según el análisis de las secuencias de la librería de clones realizada en la muestra de octubre 2005 del lodo del reactor B se obtuvieron secuencias pertenecientes a los grupos beta, gamma, alfa y epsilon de Proteobacteria, y a los fila *Choroflexi*, *Nitrosospira*, y *Planctomycetes* predominando las secuencias afiliadas al grupo beta Proteobacteria. No se obtuvo ninguna secuencia afiliada al filum *Firmicutes*.

Se construyo el árbol filogenético con las secuencias del gen ARNr 16S con la muestra del lodo del reactor B de octubre del 2005. Para la construcción del árbol se seleccionaron secuencias representativas y fueron alineadas con secuencias relacionadas, obtenidas del la base del NCBI, con Clustal W. El árbol filogenético fue realizado utilizando el programa MEGA versión 3.1 (Kumar et al. 2004). El dendograma fue generado con distancias filogenéticas utilizando el algoritmo Neighbor-Joining y el modelo de matrix Dayhoff.



referencias  
 ● Cepas aisladas en la optimización de estrategias de aislamiento de desnitrificantes  
 ▲ clones  
 ■ cepas aisladas con a lo largo del tiempo o en los métodos Ay E

Figura 19: Árbol filogenético del gen ARNr 16S de una biblioteca de clones de una muestra del lodo del reactor B y secuencias de aislamientos. Los números cerca de los nodos indican los valores de bootstrap calculados en base a 100 set de datos. La barra indica la cantidad de mutaciones en 100.

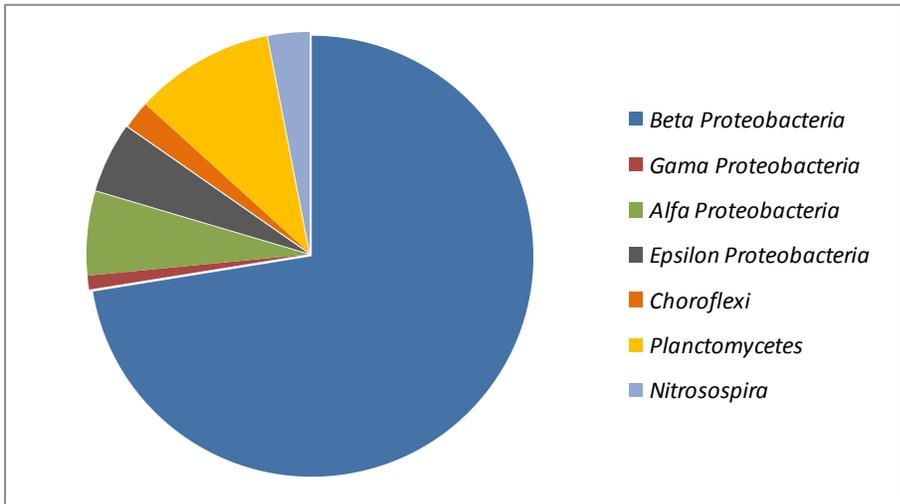


Figura 20: Distribución de las secuencias de clones de la biblioteca de genes de ARNr 16S de acuerdo al análisis filogenético efectuado en la muestra del reactor B de octubre del 2005.

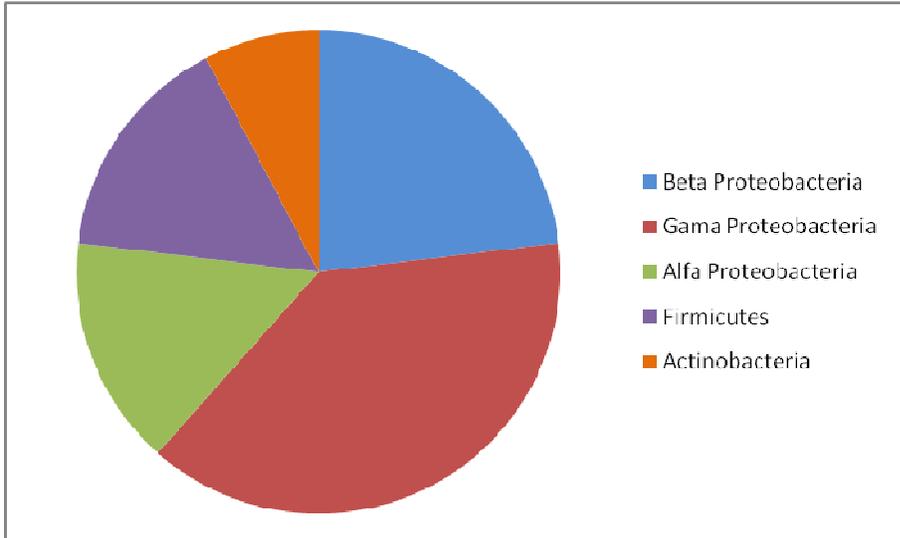


Figura 21: Distribución de las secuencias del gen del ARNr 16S de cepas aisladas del lodo del reactor B de las muestras de setiembre y diciembre 2006 utilizando diferentes estrategias.

Las secuencias del gen del ARNr 16S de las cepas aisladas de muestras de lodo del reactor B se agruparon con secuencias pertenecientes a beta, gama, y alfa Proteobacteria y al filum *Firmicutes*. No se aisló ninguna cepa cuya secuencia se agrupara con secuencias del grupo epsilon de Proteobacteria, ni de los fila *Choroflexi*, *Nitrosospira* y *Planctomycetes*.

## Análisis de la comunidad microbiana de muestras del reactor B mediante T- RFLP del gen ARNr 16S

Para estudiar la dominancia de los aislamientos en la comunidad microbiana total, se determinó la composición de la comunidad microbiana de dos muestras del reactor B mediante T-RFLP del gen ARNr 16S. Se buscó entonces correlacionar los picos predominantes en el T-RFLP con los aislamientos. En la figura 22 se puede observar que de 13 T-RF presentes en las dos muestras analizadas, 7 (75, 79, 160, 202, 206, 331 y 337 nucleótidos) estaban presentes en ambas muestras.

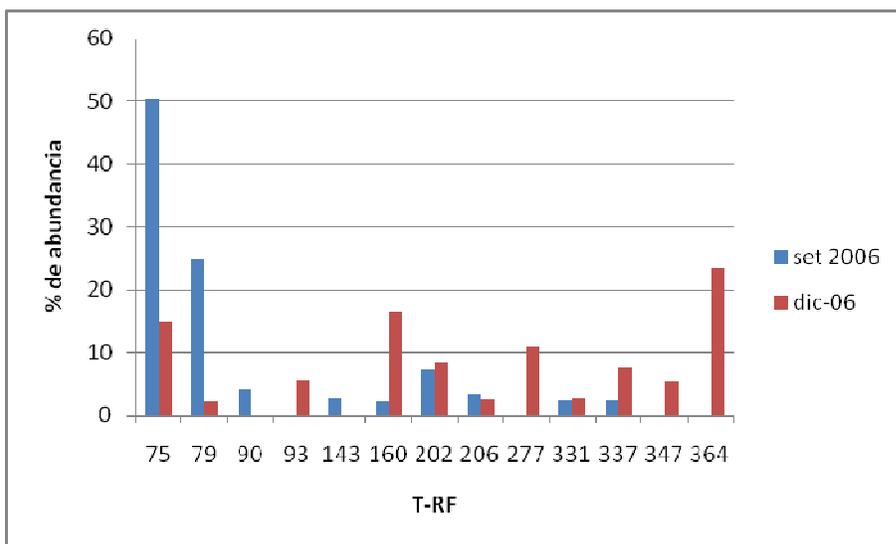


Figura 22: Esquema del perfil de T-RFLP del gen ARNr 16 S de las muestras de set 2006 y dic 2006 del lodo del reactor B con la enzima *HhaI*. En el eje x se indica el tamaño de los fragmentos (en nucleótidos) en el eje y la abundancia relativa calculada a partir de la intensidad de fluorescencia.

En la muestra de setiembre los T-RFs predominantes fueron los que presentaron tamaños de 75 y 79 nucleótidos. Para la muestra de dic 2006 los T-RFs predominantes fueron los de tamaños 75, 160 y 364 nucleótidos.

**Tabla 15: Corte “*in silico*” de las secuencias del gen del ARNr 16S utilizando la enzima *HhaI* de las cepas aisladas.**

	cepas	T-RF
<i>Paracoccus versutus</i>	B 20	8
<i>Paracoccus versutus</i>	B 62	11
<i>Hidrogenophaga sp.</i>	B 92 *	34
<i>Hidrogenophaga sp.</i>	B127 *	36
<i>Hidrogenophaga sp.</i>	B103 *	37
<i>Pseudomonas sp.</i>	B 39	78
<i>Pseudomonas sp.</i>	B118 *	78
<i>Thauera sp.</i>	B 63	90
<i>Aeromonas sp.</i>	B107 *	125
<i>Brachymonas sp.</i>	B104 *	141
<i>Exiguobacterium sp.</i>	B 73	143
<i>Aeromonas sp.</i>	B109 *	146
<i>Thauera sp</i>	B 72	150
<i>Pseudomonas sp</i>	B 36	155
<i>Pseudomonas sp</i>	B 43	155
<i>Acidovorax sp.</i>	B 96 *	160
<i>Chyseeobacterium sp</i>	B120 *	173
<i>Bacillus pumilus</i>	B 28	193
<i>Rizobiales sp.</i>	B158 *	280
<i>Gordonia sp.</i>	B160 *	294
<i>Micrococccus sp.</i>	B138 *	315
<i>Mycobacterium sp.</i>	B153 *	317
<i>Enterobacter sp.</i>	B115 *	324
<i>Paracoccus desnitrificans</i>	B 66	446
<i>Paracoccus desnitrificans</i>	B113 *	446
<i>Paracoccus desnitrificans</i>	B137 *	461
<i>Comamonas sp.</i>	B101 *	508
<i>Trichococcus flocculiformis</i>	B 93 *	528
<i>Bacillus subtilis</i>	B 94 *	539

(\*) Cepas aisladas del reactor B en las mismas muestras en las que se realizó el T-RFLP (set 2006 y dic 2006).

De acuerdo con los resultados de análisis de restricción “*in silico*” de las secuencias obtenidas para los aislamientos con la enzima *Hhal*, se pudo correlacionar los siguientes fragmentos: el T-RF de 78 nucleótidos se correlacionó con las cepas B39 y B118 pertenecientes al género *Pseudomonas*, el T-RF de 90 nucleótidos se correlacionó con la cepa B63 del género *Thauera*, el T-RF de 143 nucleótidos se correlacionó con la cepa B73 del género *Exiguobacterium*, y el T-RF de 160 nucleótidos se correlacionó con la cepa B96 perteneciente al género *Acidovorax*.

En la muestra de setiembre 2006 los picos correlacionados representan una abundancia del 34 % y en la muestra de diciembre 2006 el % de abundancia de los picos correlacionados es del 19 %.

El tamaño de fragmento (TR-F) calculado para las cepas B20, B62, B92, B127 y B103 utilizando la enzima *Hhal*, fue menor a 50 nucleótidos por lo tanto no se pudieron correlacionar con picos del T-RFLP ya que en el análisis no se tienen en cuenta los fragmentos con tamaño menor a 50 nucleótidos. No se pudo determinar entonces su presencia o ausencia en los cromatogramas del TRFL-P obtenidos con la enzima *Hhal*. Sin embargo, los fragmentos obtenidos mediante el análisis utilizando la enzima *MspI* fueron mayores a 50 nucleótidos y tampoco se pudieron detectar en los cromatogramas del TRFLP obtenidos utilizando la enzima *MspI* para ninguna de las dos muestras estudiadas.

### Estudio de la diversidad de bacterias desnitrificantes mediante T-RFLP del gen *nirS*

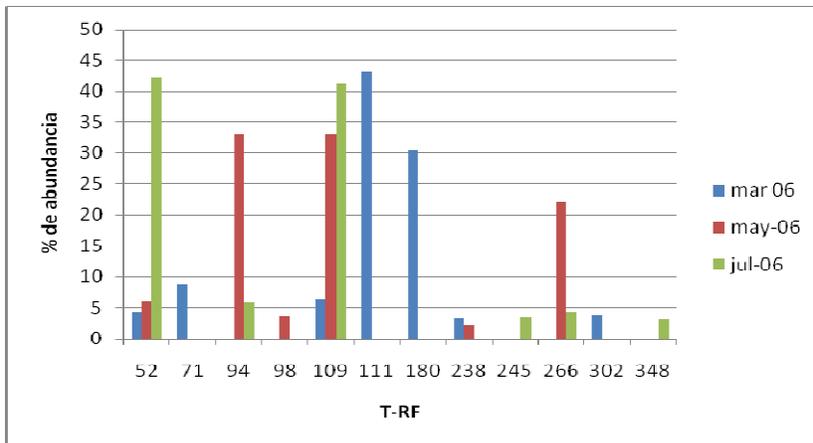


Figura 23: Esquema del TRFLP- *nirS* de lodo B en diferentes fechas utilizando la enzima de digestión *Hhal*. En el eje de las x se encuentra el tamaño del fragmento y en el eje de las y el porcentaje de abundancia de cada fragmento.

Para determinar la abundancia de las cepas aisladas en la comunidad total de desnitrificantes, se estudió ésta mediante T-RFLP utilizando un gen funcional de la desnitrificación (el gen de nitrito reductasa, *nirS*). El análisis se realizó para tres muestras del lodo del reactor B. Los resultados muestran que dos fragmentos de 52 y 109 nucleótidos están presentes en las tres muestras del lodo del reactor B estudiadas. Según un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (Cabezas et al., 2009) estos picos se pudieron correlacionar con secuencias de clones que se afiliaron a los géneros *Acidovorax* (T-RF de 52 nucleótidos) y *Thauera* (T-RF de 109 nucleótidos), además este T-RF se corresponde con el fragmento determinado *in silico* a partir de la secuencia de *nirS* de la cepa 63 (género *Thauera*). El T-RF de 70 nucleótidos puede asociarse a secuencias del género *Paracoccus* (cepa 20).

## DISCUSIÓN

### Optimización del método de aislamiento

En el trabajo de Heylen, et al (2006), se plantea una forma de evaluar las diferentes estrategias mediante el índice de Fitness, éste tiene en cuenta el índice estadístico de diversidad de Simpson y el porcentaje de cepas desnitrificantes aisladas con cada método. Según este índice el método que recuperó mayor diversidad de desnitrificantes fue el método I con un  $F= 0,56$  y  $R=0,75$ . La estrategia I utiliza como medio de cultivo un medio mineral con succinato, etanol y acetato como sustrato y nitrato. En el trabajo de Heylen et al. (2006) se concluyó que los mejores medios para aislar bacterias desnitrificantes son los siguientes tres: G2M11 (succinato como sustrato y nitrito con una relación carbono/nitrito de 20); G3M12 (etanol como fuente de carbono y nitrato con una relación carbono/nitrato de 18) y G4M3 (succinato y nitrato en una relación carbono/nitrato de 20).

En el trabajo de Heylen (2007), se obtuvo el valor máximo de R utilizando etanol como sustrato en medio mineral, en este trabajo el R mayor se obtuvo cuando se utilizó medio mineral con succinato, etanol y acetato como sustrato (estrategia I).

Si bien el método con mayor Fitness fue la estrategia I (aislamiento directo en placa con medio mineral con acetato, succinato, etanol y nitrato), la estrategia que recuperó mayor diversidad de géneros de desnitrificantes fue el método E, en este método se aisló las cepas a partir del recuento de bacterias heterótrofas en TSA. Esta estrategia tiene un valor de Fitness R cercano a los máximos obtenidos.

Si bien con los métodos C, K, O y P se obtuvo un 100 % de bacterias desnitrificantes ( $R = 1$ ), éstas pertenecían a un mismo género con lo cual estos métodos no son buenos para aislar una mayor diversidad de desnitrificantes.

En nuestro laboratorio tradicionalmente se utilizaron para aislar bacterias desnitrificantes las estrategias A y E. Con el método A se aislaron al igual que con el método I tres géneros diferentes de bacterias desnitrificantes. En este trabajo de Tesis el objetivo de obtener aislamientos era, además de conocer la composición de la flora desnitrificante, contar con un grupo representativo de cepas diferentes que pudieran presentar diferentes condiciones de sedimentación. A priori, se consideró que organismos de diferentes géneros podrían presentar una mayor diferencia en el comportamiento de sedimentación, por lo tanto se priorizó el obtener aislamientos de diferentes géneros de desnitrificantes. De acuerdo con este criterio los métodos A y E utilizados tradicionalmente en el laboratorio se consideraron adecuados para aislar bacterias desnitrificantes para este trabajo.

## Diversidad de los aislamientos

### ***Diversidad de los aislamientos obtenidos por los distintos métodos.***

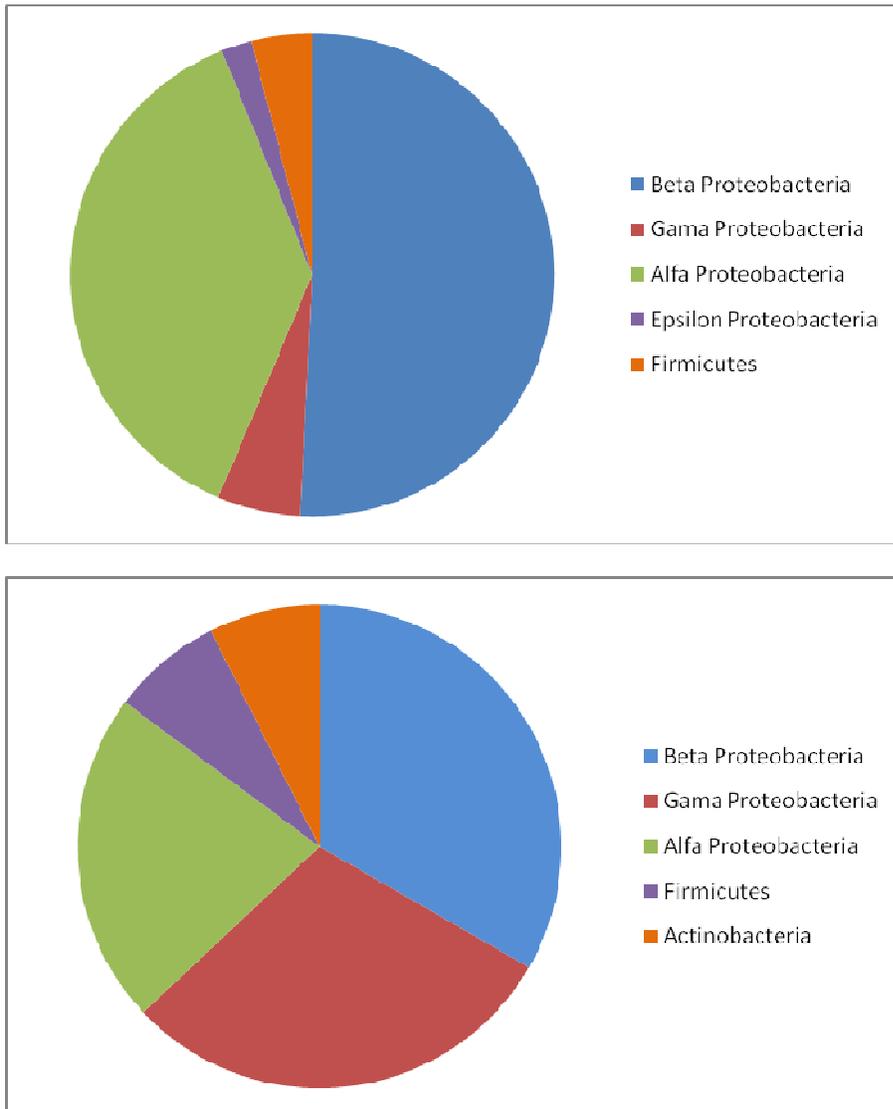


Figura 24: Resultados de los aislamientos obtenidos en la optimización de los métodos de aislamiento de este trabajo comparado con los obtenidos en el trabajo de Heylen et al. (2006). En la parte superior de la figura se muestran los resultados de los aislamientos del trabajo de Heylen et al. 2006 y en la parte inferior se muestran los aislamientos de este trabajo de tesis. Para estos gráficos solo se consideraron los géneros de cepas desnitrificantes.

En este trabajo se aislaron microorganismos que se afiliaron a los grupos alfa, beta, gama de Proteobacteria y a la clase *Firmicutes* y *Actinobacteria* de acuerdo al análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S. Se observó un alto predominio de Proteobacteria y una

baja dominancia de *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Resultados similares fueron obtenidos por el trabajo de Heylen (2006) (Figura 24) si bien la proporción de aislamientos dentro de cada grupo fue diferente. Los aislamientos que fueron desnitrificantes se clasificaron como pertenecientes a los géneros *Acidovorax*, *Paracoccus*, *Hidrogenophaga*, *Trichococcus*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Shinella*, *Brachymonas* y *Mycobacterium*. Organismos pertenecientes a todos estos géneros de desnitrificantes fueron también reportados en el trabajo de Heylen (2007).

Si bien las estrategias de aislamiento de estos autores fueron diferentes al aplicado en nuestro trabajo, los aislamientos se caracterizaron dentro de los mismos grupos. En particular un gran predominio de aislamientos afiliados a los géneros *Acidovorax* y *Paracoccus* fue encontrado en ambos trabajos. Organismos de estos dos grupos fueron detectados también por técnicas de biología molecular en nuestro trabajo así como en otros trabajos (Hallin et al., 2006; Sheng et al., 2008). Estos resultados indican que estos microorganismos tienen un importante papel en la flora desnitrificante de reactores de tratamiento de efluentes.

Unos pocos aislamientos se afiliaron a la clase *Actinobacteria*, estas cepas fueron todas aisladas por aislamiento directo en medios de cultivo con pocos nutrientes y con sustratos complejos. Estos aislamientos no se detectaron por ninguna otra técnica. Probablemente estos organismos están en baja proporción y lograron competir gracias a los bajos requerimientos en nutrientes.

**Tabla 16: Resumen de las cepas aisladas en los lodos de los reactores B, M y F y detección de las mismas por técnicas de biología molecular.**

filum	género	desnit	método	reactor	detectados con algun método de biología molecular			
					biblioteca del gen ARN 16S	T-RFLP 16S	T-RFLP nirS	Trabajo de Heylen 2007
beta	<i>Acidovorax</i>	si	E, H	B	si	si	si	si
beta	<i>Brachymonas</i>	si	A	B, M	no	no	no	si
beta	<i>Comamonas</i>	si	B	B	no	no	no	si
beta	<i>Hidrogenophaga</i>	si	A, E, F, G, I	B	si	no	no	no
beta	<i>Thauera</i>	si	*	B, M	si	si	si	si
beta	<i>Azonexus</i>	si	A	M	no	no	no	si
Actinobacteria	<i>Gordonia</i>	no	G	B	no	no	no	-
Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	no	L	B	no	no	no	-
Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i>	si	N	B	no	no	no	no
alfa	<i>Paracoccus</i>	si	B, C, F, I	B	si	no	si	si
alfa	<i>Shinella</i>	si	I	B, M	no	no	no	no
alfa	<i>Ochrobactrum</i>	si	A	F	no	no	no	si
fimic	<i>Trichococcus</i>	si	E, F	B	si	no	no	si
fimic	<i>Bacillus</i>	??	E, F, H	B, F	no	si	no	si
gama	<i>Pseudomonas</i>	si	A, B, E, J, O	B	si	si	no	si
gama	<i>Aeromonas</i>	no	A, B, K	B	no	no	no	-
gama	<i>Enterobacter</i>	no	A, B, D	B	no	no	no	-
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium</i>	no	E	B	no	no	no	si
* se aislo previamente con metodo A y E								

(\*) Se aisló previamente con el método A y E en muestras del reactor B

### **Diversidad de desnitrificantes en las muestras de los tres reactores**

Las tres muestras presentaron preponderancia de diferentes organismos desnitrificantes y solo dos géneros (*Thauera* y *Brachymonas*) de un total de 12, fueron detectados en muestras de dos reactores diferentes. No se detectó un microorganismo preponderante en la muestra de los reactores F y M que pueda explicar la mala sedimentación de la biomasa de esos reactores. En otros tipos de problemas de sedimentación como el bulking filamentoso fue posible asignar esos problemas a la presencia de un microorganismo preponderante con características filamentosas (Martins, 2004)

En las muestras del reactor B hubo una alta frecuencia de aislamientos de cepas del género *Paracoccus* (se aislaron microorganismos de este género en 9 de las 11 muestras analizadas). Organismos de este género fueron aislados utilizando 4 estrategias diferentes de cultivo y aislamiento, si bien de acuerdo a los resultados de estudio de la comunidad por técnicas de biología molecular (T-RFLP y librería de clones), este grupo no sería el más dominante. Esto demuestra el sesgo del método de aislamiento. Probablemente organismos del género *Paracoccus* tengan buena capacidad de crecer en los medios de cultivo aplicados en este trabajo. En el trabajo de Heylen (2007) dentro de

las cepas afiliadas a alfa Proteobacteria el género más frecuentemente aislado fue *Paracoccus*.

Solo tres de los 25 aislamientos estudiados presentaron el gen *nirK* los restantes presentaron el gen *nirS*. Esto está de acuerdo con el trabajo de Heylen (2007) donde el gen *nirS* es más abundante en la naturaleza que el *nirK*.

### **Correlación de los aislamientos con la comunidad microbiana total**

En el T-RFLP del gen del ARNr 16 S se observó que los fragmentos predominantes fueron el de 75 nucleótidos (nt), con un porcentaje de abundancia del 50%, el de 70 nt (25%), el de 160 nt (16%) y el 364 nt (23%).

Con las estrategias utilizadas en este trabajo no se logró aislar una cepa con un tamaño de fragmento esperado (T-RF) de 75 nt que fue el fragmento más abundante, ni del de 364 nt, sin embargo, se aislaron cepas con T-RF de 78 nt (*Pseudomonas*) y de 160 nt (*Acidovorax*).

Se ha reportado previamente que puede haber un corrimiento en el tamaño de los fragmentos del T-RFLP debido al mayor peso molecular del fragmento marcado con el fluoróforo usado en el T-RFLP con respecto al marcador de peso molecular marcado con otro compuesto fluorescente (Cabezas, 2005). Teniendo en cuenta este corrimiento, podría correlacionarse el pico de 75 nt con la cepa del género *Pseudomonas* (tamaño esperado de 78 nt). Otra posible causa del corrimiento en la asignación del tamaño de los fragmentos es la mutación de una base en el sitio de corte de la enzima. Esto produciría un fragmento diferente al esperado. También podría suceder que el microorganismo representado por el pico de 75 nt fuera no desnitrificante y por lo tanto no haya sido seleccionado en las condiciones de cultivo utilizadas.

Si bien en las muestras analizadas mediante T-RFLP no se aislaron cepas del género *Thauera* (T-RF 90) o del género *Exiguobacterium* (T-RF 143), se observaron en el cromatograma picos de estos tamaños. Estas cepas fueron aisladas de ese mismo reactor pero en otras muestras lo que confirmaría su presencia en el reactor. El hecho de no haber aislado estas cepas en las muestras analizadas por T-RFLP podría deberse a que la selección de las cepas fue realizada de acuerdo a la morfología de la colonia. Se seleccionaron las cepas con morfología diferente y por lo tanto cepas diferentes con morfología similar pueden haber quedado sin aislar.

En cuanto a la biblioteca de clones, la secuencia de la OTU predominante en la muestra de octubre 2005 del lodo del reactor B presentó similitud con las secuencias del género *Acidovorax* dentro de la familia *Comamonaceae*, con las estrategias utilizadas en este trabajo se han aislado microorganismos de esta familia en otras muestras del mismo reactor. En cuanto el género *Pseudomonas* se encontraron tanto en la biblioteca de clones (en baja proporción) como en los aislamientos a lo largo del tiempo.

No se encontraron clones con secuencias que se afiliaran a la clase *Firmicutes* pero en el T-RFLP del gen del ARNr 16S se observó un pico que podría asociarse a organismos de esta clase (T-RF de 143 nt). Como la biblioteca de clones fue realizada en una muestra anterior a las muestras en que se realizó el T-RFLP, esta diferencia puede deberse a que microorganismos de esta clase estuvieran en baja abundancia en la muestra de la biblioteca y luego hayan aumentado su abundancia en las muestras del T-RFLP. La otra posibilidad es que haya un sesgo en el método de clonado como ya ha sido reportado en otros trabajos (Rajendhran et al., 2010)

En el T-RFLP del gen *nirS* se pudieron correlacionar algunos de los picos predominantes. El T-RF 52 nt podría representar a organismos del género *Acidovorax* según el trabajo de Cabezas et al. (2009); el T-RF de 71 nt se correlaciona con organismos del género *Paracoccus* (según el corte “*in silico*” de las secuencias de *nirS* de las cepa B62 y B20). El T-RF de 109 nt podría corresponder a organismos del género *Thauera* según el corte “*in silico*” de la secuencia de *nirS* correspondiente a la cepa B63.

De acuerdo con estos resultados, con los métodos de aislamiento utilizados se pudieron aislar cepas predominantes dentro de la comunidad desnitrificante y de la población total. Un total de 7 de los 10 géneros de desnitrificantes detectados en las muestras del reactor B pudieron detectarse por otros métodos de biología molecular. Sin embargo, hay un amplio grupo de bacterias que no se aislaron en este trabajo. Por ejemplo no se aisló ninguna cepa perteneciente a los fila *Planctomycetes* ni *Chloroflexi*. Se ha reportado que estos microorganismos son difíciles de aislar (Speirs et al., 2009, Sekiguchi et al., 1999 y Sekiguchi 2001 et al., 2001).

Los organismos del filum *Chloroflexi* son asociados a lodos con más de 15 días de operación y generalmente aparecen en sistemas que remueven fósforo, donde la biomasa

es reciclada repetidamente por ciclos de aerobiosis y anaerobiosis. Sekiguchi et al. (1999) y (2001) reportaron que el subfilum I de las bacterias pertenecientes al filum *Chloroflexi* puede afectar la granulaci3n o producir el bulking en lodos de tratamientos de efluentes metanog3nicos.

El conocimiento de los *Planctomycetes* es limitado ya que se han podido cultivar muy pocos representantes de este filum. Estos microorganismos son: quimiorgan3trofos obligados o facultativos, aut3trofos o fot3trofos. En muchos estudios se describen clones de *Planctomycetes* de bibliotecas realizadas con el gen del ARNr 16S de diferentes ambientes como suelos, reactores an3xicos, sedimentos an3xicos, reactores de escala laboratorio y reactores de tratamiento de aguas residuales. En todos estos trabajos se encontr3 un bajo porcentaje de estos microorganismos, se postula que este bajo porcentaje se debe a que se encuentran en baja proporci3n o a que los cebadores universales no son adecuados para amplificar este grupo (Chouari et al. 2003).

Tampoco se aisl3 ninguna cepa perteneciente al filum *Nitrosospira*, los microorganismos de este grupo son nitrificantes oxidantes de amonio (Poth, et al., 1985, Schmidt, et al., 2004), este trabajo se enfoc3 en el estudio de bacterias desnitrificantes por lo tanto no se utilizaron condiciones de cultivo adecuadas para aislar organismos nitrificantes.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir que la estrategia de aislamiento afecta el tipo de microorganismos que se aisla. La selecci3n del m3todo para aislar cepas desnitrificantes depender3 entonces del objetivo del trabajo. Para obtener una mayor diversidad de cepas desnitrificantes el m3todo de elecci3n es el que utiliza medio mineral con acetato, succinato y etanol como fuente de carbono (estrategia I). Si el objetivo es aislar una mayor diversidad de g3neros de desnitrificantes el m3todo de elecci3n es el m3todo E donde se aislan las cepas en TSA a partir del recuento de bacterias heter3trofas. En este trabajo de Tesis el objetivo de obtener aislamientos era, adem3s de conocer la composici3n de la flora desnitrificante, contar con un grupo representativo de cepas diferentes que pudieran presentar diferentes condiciones de sedimentaci3n. A priori, se consider3 que organismos de diferentes g3neros podr3an presentar una mayor diferencia en el comportamiento de sedimentaci3n, por lo tanto se prioriz3 el obtener

aislamientos de diferentes géneros de desnitrificantes. De acuerdo con este criterio los métodos A y E utilizados tradicionalmente en el laboratorio se consideraron adecuados para aislar bacterias desnitrificantes para este trabajo.

De acuerdo a la caracterización de los aislamientos se puede concluir que no existe un patrón de géneros que diferencie los lodos de los reactores con malas y buenas propiedades de sedimentación. Las tres muestras presentaron preponderancia de diferentes organismos desnitrificantes.

Existe una correlación entre los aislamientos y los picos más abundantes en los T-RFLP tanto de *nirS* como del gen del ARNr 16S. Sin embargo varios de los picos presentes en ambos T-RFLP no se pudieron correlacionar con aislamientos y varios aislamientos no se correlacionaron con picos predominantes. Estos resultados claramente indican el sesgo de los métodos.

A pesar de estos sesgos, y de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo así como por otros autores se puede concluir que las bacterias desnitrificantes más abundantes en sistemas de tratamiento de efluentes se afilian a los géneros *Thauera*, *Acidovorax*, *Hidrogenophaga*, *Comamonas*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* y *Brachymonas* dentro de Proteobacteria.

# **CAPÍTULO 3**

***Características de agregación de los  
aislamientos y efecto de diferentes  
condiciones de cultivo en la agregación***



## OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### **1- Determinar si hay una relación entre la capacidad de agregación de los aislamientos y el comportamiento de sedimentación de los lodos de los reactores.**

Se determinó la capacidad de agregación de las cepas aisladas de muestras de los diferentes reactores.

### **2- Determinar si existen condiciones de crecimiento que favorecen la buena sedimentación**

Se realizó el ensayo de agregación en diferentes condiciones de cultivo, utilizando diferentes sustratos y concentraciones de nitrato.

### **3- Determinar si existe una relación entre la velocidad de desnitrificación y la capacidad de sedimentar de los aislamientos**

Se determinó la actividad específica desnitrificante de aislamientos con diferente capacidad de sedimentación.

## MÉTODOS

### **Determinación de la capacidad de agregación de los aislamientos**

Para determinar propiedades de agregación de las cepas desnitrificantes aisladas se realizó el ensayo de agregación según (Burdman et al., 1998). Para ello se inocularon tubos con 8 mL de medio de cultivo (BCY) suplementado con acetato como sustrato con un inóculo proveniente de un cultivo fresco de las cepas a estudiar. Los tubos se incubaron a 35 - 37 °C hasta observarse viraje del indicador. Se midió la turbidez a 600 nm antes y después de agitar el tubo durante un minuto a máxima velocidad utilizando un vortex. Se calculó el % de agregación según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Agregación} = (A_T - A_0) / A_T \times 100$$

Siendo:  $A_T$ : Absorbancia a 600 nm luego de agitar y  $A_0$ : Absorbancia a 600 nm antes de agitar

Con esta misma técnica se determinó el % de agregación a lo largo de la curva de crecimiento de 4 cepas aisladas.

Para estudiar el comportamiento de agregación con diferentes sustratos se utilizó la misma técnica descrita pero se utilizó como medio de cultivo BCY suplementado con acetato (12 mM) y BCY suplementado con etanol (5 mM).

Para estudiar el efecto de la concentración de nitrato se realizó el mismo ensayo utilizando medios de cultivo con diferentes concentraciones iniciales de nitrato (7,1 mM, 14,0 mM y 23,9 mM).

### **Determinación de la capacidad de desnitrificar con diferentes sustratos**

Se realizó el ensayo de crecimiento y producción de  $N_2O$  descrito anteriormente utilizando como sustrato Etanol (5 mM), Acetato (12 mM) y Metanol (8 mM) y  $NO_3^-$  en todos los casos (7,1 mM).

### **Determinación de la actividad desnitrificante de las cepas**

Este ensayo mide la velocidad de producción de  $N_2O$  por parte de un cultivo puro con respecto al tiempo. Se determinó la actividad desnitrificante de las cepas aisladas de los diferentes lodos según la técnica descrita en Etchebehere et al. (2001) utilizando como sustratos acetato o etanol (anexo 12).

## **RESULTADOS**

### **Capacidad de agregación de los cultivos**

Se observó que algunos de los aislamientos formaban agregados al crecer en medio de cultivo líquido en condiciones desnitrificantes. Estos agregados se flotaban al retener burbujas (probablemente burbujas de  $N_2$ ) causando flotación de toda la biomasa del cultivo (Figuras 25 y 26). Esta propiedad de agregación y flotación no se produjo en todas las cepas y podría estar relacionada con las condiciones de mala sedimentación de los lodos. Para cuantificar este efecto se realizó el test de agregación descrito por Burdman et al. (1998). Como se especifica en la sección de Métodos esta técnica se basa en determinar la Absorbancia a 600 nm del cultivo sin agitación y luego de una agitación brusca de modo de romper los agregados. De esta forma se calcula el porcentaje de agregación de cada cepa en cada medio de cultivo líquido. Si bien la capacidad de

agregación ha sido asociada a buena sedimentación de lodos (se deben formar agregados o flóculos para que el lodo sedimente), en el caso de estos aislamientos siempre la agregación estuvo relacionada con la flotación de la biomasa por retención de burbujas. Por lo tanto se puede relacionar directamente una alta capacidad de agregación con flotación de la biomasa.



Figura 25: Fotografía del cultivo en medio líquido de la cepa M01 donde se observa que la agregación de la biomasa está asociada a la retención de burbujas y a la flotación de la biomasa.



Figura 26: Fotografía del cultivo en medio líquido de la cepa B20 donde se muestra la retención de burbujas por los agregados y la flotación de la biomasa.

Para determinar si la capacidad de agregación variaba con la fase de crecimiento, se eligieron 4 cepas representativas de los reactores B y M y se determinó el porcentaje de agregación durante las diferentes etapas del crecimiento.

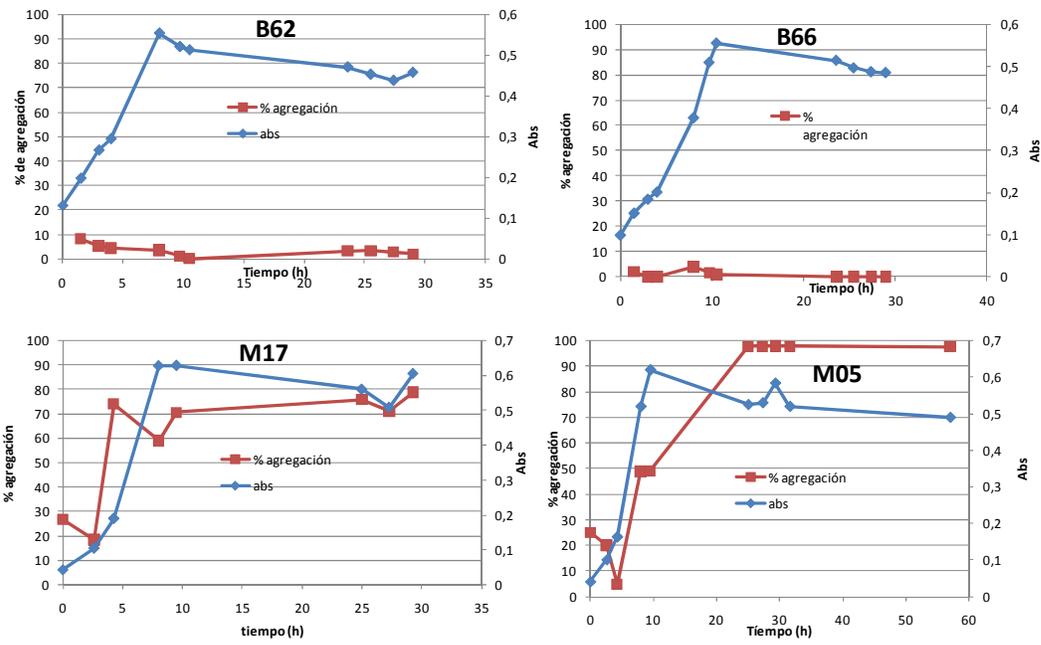


Figura 27: Variación del porcentaje de agregación de un cultivo de la cepa B66, B62, M17 y M05 en el medio BCY suplementado con acetato y nitrato cultivo a lo largo de la curva de crecimiento.

Los resultados muestran que en las cepas aisladas del reactor M (M05 y M17) el porcentaje de agregación aumentó al aumentar la densidad óptica, manteniéndose constante en la fase estacionaria de crecimiento, mientras que las cepas que se aislaron del reactor B (B62 y B66) presentaron baja capacidad de agregación en todas las fases del crecimiento (Figura 27). De acuerdo con estos resultados se decidió medir la agregación en el comienzo de la fase estacionaria.

En la tabla 17 se presentan los resultados de agregación en cultivo líquido determinada por la técnica de Burdman et al. (1998). Se tomó como criterio de ensayo positivo los valores de agregación mayores al 50 %. Se realizó este ensayo por duplicado, se puede observar que el método de agregación tiene una desviación estándar máxima de 10 %, por lo tanto en este trabajo no se consideraron como positivos o negativos los resultados cuyo % de agregación estuvieron entre 40 % a 60 % (dado que la desviación del método en este rango puede dar tanto un resultado positivo como negativo). Se tomó entonces el criterio de resultado de agregación positivo cuando el % de agregación fue mayor de 60 % y negativo cuando el % de agregación fue menor de 40 %.

**Tabla 17: Porcentajes de agregación de diferentes aislamientos en medio BCY con acetato y nitrato.**

Cepa	% agregación	Promedio	desv. St
B 39	50	55	7
B 39	60		
F10	48	41	10
F10	33		
F25	0	0	0
F25	0		
B 36	44	40	6
B 36	36		
B158	17	22	6
B 158	26		

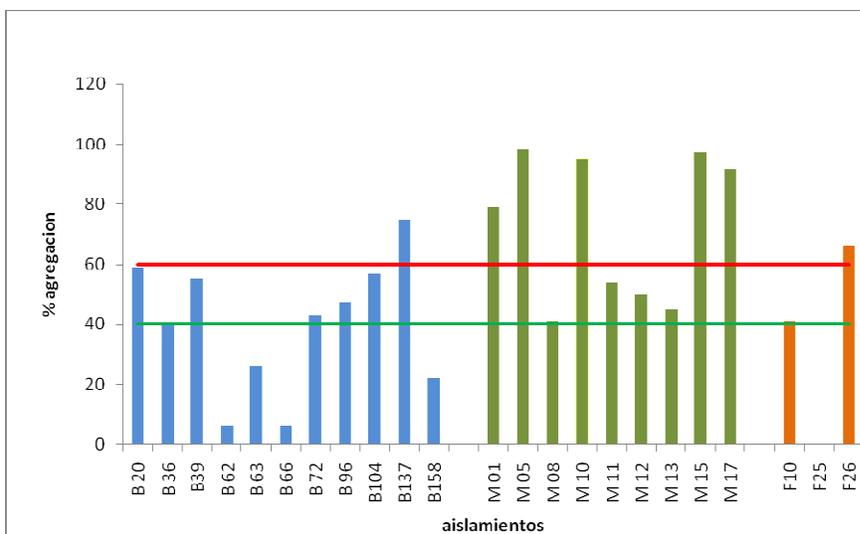


Figura 28: Porcentaje de agregación de las cepas aisladas de los lodos de los reactores B, M y F.

En la figura 28 se puede observar que 5 de las 9 cepas estudiadas del reactor M (con problemas de flotación) presentan un porcentaje de agregación positivo y ninguna cepa tiene un porcentaje de agregación menor a 40%. Solo una cepa del reactor B (con buenas propiedades de sedimentación) presenta un % de agregación superior al 60%.

**Tabla 18: Resultados del ensayo de agregación de las cepas aisladas de los lodos de los reactores B, F y M, género al que pertenecen de acuerdo al análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S y perfil de ARDRA.**

cepa	ensayo de agregación	género	Perfil
B 20	+	<i>Paracoccus</i>	5
B 36	-	<i>Pseudomonas</i>	6
B 62	-	<i>Paracoccus</i>	5
B 63	-	<i>Thauera</i>	11
B 66	-	<i>Paracoccus</i>	8
B 72	+/-	<i>Thauera</i>	13
B 96	+/-	<i>Acidovorax</i>	3
B104	+/-	<i>Brachymonas</i>	10
B137	+	<i>Paracoccus</i>	4
B158	-	Nd	1
F 10	-	<i>Bacillus</i>	Nd
F 25	-	<i>Bacillus</i>	Nd
F 26	+	<i>Ochrobactrum</i>	Nd
M 01	+	<i>Thauera</i>	B
M 05	+	<i>Brachymonas</i>	D
M 08	+/-	<i>Shinella</i>	C
M 10	+	Nd	E
M 11	+/-	<i>Shinella</i>	C
M 12	+/-	<i>Azonexus</i>	A
M 13	+/-	<i>Thauera</i>	B
M 15	+	Nd	F
M 17	+	<i>Brachymonas</i>	D

En la tabla 18 se observa el resultado del test de agregación para los aislamientos de los tres reactores y el género al que pertenecen estas cepas de acuerdo al análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S. Se especifica también el perfil de ARDRA. Cabe aclarar que cepas pertenecientes al mismo género pero con diferente perfil de ARDRA probablemente pertenezcan a diferente especie, mientras que cepas con idéntico perfil pertenecerían a la misma especie (o por lo menos a especies muy relacionadas).

En los datos presentados en la tabla 18 se puede observar que cepas con igual perfil de ARDRA presentaron diferente comportamiento de agregación. Las cepas B20 y B62 presentaron idéntico perfil de ARDRA y diferente propiedad de agregación (la cepa B20 presentó resultado positivo mientras que la B63 negativo). Aquellas cepas cuyo % de agregación se encontró entre 40 y 60 no se tomaron como positivos ni como negativos ya que según la desviación estándar calculada para el método no es posible afirmar si estas cepas presentan un porcentaje de agregación mayor o menor al 50 %.

**% de agregación**

<b>género</b>	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>Acidovorax</i>						x					
<i>Azonexus</i>						x					
<i>Bacillus</i>	x				x						
<i>Brachymonas</i>							x			x	x
<i>Comamonas</i>											
<i>Hidrogenophaga</i>											
<i>Ochrobactrum</i>								x			
<i>Paracoccus</i>		x					x		x		
<i>Pseudomonas</i>					x						
<i>Shinella</i>					x	x					
<i>Thauera</i>				x	x	x			x		



Figura 29: Géneros de los aislamientos y sus respectivos porcentajes de agregación en medio BCY con acetato como sustrato.

En la figura 29 se puede observar que aislamientos pertenecientes a un mismo género presentan diferentes porcentajes de agregación.

### **Agregación con diferentes concentraciones de nitrato**

Para determinar si la concentración de nitrato inicial en el medio de cultivo afecta las condiciones de agregación de las cepas, se realizó el ensayo de agregación utilizando 3 concentraciones diferentes de nitrato manteniendo la misma concentración de acetato,

obteniendo por lo tanto diferente relación C/N en el medio de cultivo. En todos los casos la concentración de dador de electrones (acetato) estuvo en exceso con respecto a la concentración de aceptor de electrones (nitrato). Estos estudios se realizaron en 4 cepas (3 con ensayo de agregación negativa y una con ensayo de agregación positivo).

**Tabla 19: Ensayo de agregación de las diferentes cepas utilizando medio BCY con diferente relación Carbono-nitrógeno (C/N).**

cepa	Relación C/N	Ensayo de agregación
B 20	5,2	+
	2,7	+
	1,6	+
B 36	5,2	-
	2,7	-
	1,6	-
B 63	5,2	-
	2,7	-
	1,6	-
B 66	5,2	-
	2,7	-

En la tabla 19 se puede observar que las cepas con ensayo de agregación negativas, siempre dieron negativas independiente de la relación carbono nitrato utilizada en el medio BCY. Sin embargo para la cepa B20 (ensayo de agregación positivo), al aumentar la concentración de nitrato utilizada en el medio el ensayo de agregación se mantuvo positivo.

Para estudiar el efecto del sustrato sobre la agregación de las cepas se eligieron 6 cepas y se realizó el test de agregación de Burdman et al. (1998) en cultivos crecidos en medio BCY suplementado con nitrato y con diferentes sustratos (Acetato y etanol).

**Tabla 20: Ensayo de agregación de diferentes cepas en medio BCY con acetato (AC) y etanol (ET) como sustrato.**

cepa	sustrato	ensayo de agregación
<b>B 36</b>	AC	-
<b>B 36</b>	ET	-
<b>B 62</b>	AC	-
<b>B 62</b>	ET	-
<b>B137</b>	AC	+
<b>B137</b>	ET	+
<b>B158</b>	AC	-
<b>B158</b>	ET	+
<b>F 26</b>	AC	+
<b>F 26</b>	ET	+
<b>M 15</b>	AC	+
<b>M 15</b>	ET	-

De las 6 cepas testadas, dos cepas presentaron resultado de agregación diferente con los distintos sustratos (tabla 20). La cepa B158 presentó ensayo de agregación positivo para etanol (% agregación 85 %) mientras que con acetato la agregación fue del 22 % (ensayo negativo). La cepa M15 presentó un comportamiento inverso presentando resultado negativo con etanol, pero positivo cuando se utilizó acetato como sustrato. Las restantes cepas mantuvieron el mismo resultado cuando se utilizó uno u otro sustrato.

### **Capacidad de desnitrificación de los cultivos**

Se determinó la capacidad de desnitrificación realizando cultivos con diferentes sustratos, en los viales se agregó acetileno y se determinó el N<sub>2</sub>O acumulado. Se utilizó en todos los casos el medio mineral BCY suplementado con nitrato (7,1 mM) y los diferentes sustratos (acetato 12 mM; etanol 5 mM y metanol 8 mM).

**Tabla 21: Porcentaje de producción de N<sub>2</sub>O para las diferentes cepas utilizando como sustrato acetato, etanol y metanol.**

cepa	Acetato 12 mM	Etanol 5 mM	Metanol 8 mM
B62	87	100	100
B63	100	0	100
M01	88	79	87
M12	100	100	100
M13	82	90	93
M15	87	81	90

La mayoría de las cepas (B62, M01, M12, M13 y M15) produjeron más de un 80 % N<sub>2</sub>O a partir del nitrato inicial con los diferentes sustratos. El aislamiento B63 no creció cuando se incubó en un medio con etanol como fuente de carbono, sin embargo esta cepa pudo desnitrificar cuando se la incubó con metanol y acetato como sustrato.

**Tabla 22: Actividad desnitrificante y porcentaje de agregación de las diferentes cepas.**

cepa	Sustrato	actividad desnitrificante		ensayo de agregación
		µmN <sub>2</sub> O/ min.mg proteína	desv st	
B 20	Acetato	10,09	1,26	+
B 20	Etanol	29	11	nd
B 63	Acetato	11,42	0,44	-
B 96	Acetato	0,20	0,02	+/-
B104	Acetato	2,57	0,19	+/-
F27	Acetato	4,80	0,06	nd
M01	Acetato	0,70	0,06	+
M01	Etanol	92,1	7,6	nd
M17	Acetato	9,67	0,28	+

En la tabla se observan los valores de la actividad desnitrificante de los aislamientos en medio BCY con acetato y etanol como fuente de carbono expresado en µmoles de N<sub>2</sub>O producido por minuto y por mg de proteína y sus respectivas desviaciones estándar y el resultado del ensayo de agregación de los aislamientos (nd: no determinado).

Para determinar si la capacidad de agregación se relaciona con la velocidad de desnitrificación, se determinó la velocidad de desnitrificación de aislamientos representativos de los tres lodos en estudio.

En la tabla 22 se observa que los valores de actividades desnitrificantes para los aislamientos estudiados presentaron valores desde 0,20  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$  hasta 92,1  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$ . La cepa con mayor actividad fue aislada del lodo M con problemas de sedimentación.

La cepa M01 presentó una actividad desnitrificante mayor cuando utilizó etanol como dador de electrones (92,1  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$ ) que cuando utilizó acetato (0,70  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$ ).

Para aislamientos pertenecientes al género *Thauera* (cepas B63 y M01) se observaron valores diferentes de actividad desnitrificante utilizando acetato como sustrato (B63 11,42  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$  y M01 0,70  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$ ). Mientras que para las cepas del género *Brachymonas* los valores de actividad utilizando acetato fueron del similares (B104  $\mu\text{moles 2,57 N}_2\text{O/ min.mg proteína}$  y M17 9,67  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$ ).

No se observa una relación entre la actividad de las cepas y el ensayo de agregación, ya que cepas con valores de actividad similares, B20 y B63 presentan ensayo de agregación positivo y negativo, respectivamente.

## DISCUSIÓN

### **Características de agregación de los aislamientos**

Se observó que el porcentaje de agregación de las cepas que no presentaban flotación no cambió a lo largo de la curva de crecimiento del cultivo. Aquellas cepas que se agregaron en las condiciones del ensayo mantuvieron su porcentaje de agregación en la etapa estacionaria del crecimiento. En todos los casos estudiados, las células al agregarse retuvieron burbujas de gas (probablemente  $\text{N}_2$ ) provocando así la flotación de los cultivos. En aquellos cultivos que presentaron porcentajes de agregación bajos, menor al 50 %, no se observó flotación durante el proceso de desnitrificación.

Una mayor cantidad de cepas aisladas del reactor M, con malas propiedades de sedimentación, presentaron ensayo de agregación positivo comparado con el número de ensayos positivos de las cepas aisladas del reactor B el cual no presentó problemas de sedimentación.

Efectos de flotación similares a los observados en los cultivos de los aislamientos fueron reportados en reactores. En el trabajo de Etchebehere et al. (2002) se observaron las burbujas de gas retenidas en gránulos de un reactor desnitrificante UASB así como en el lecho del lodo. Un efecto similar fue observado durante la operación de los reactores M y F, en los que se observó flotación de los lodos durante la etapa anóxica (desnitrificación) (Gutiérrez et al., 2006).

Estos resultados sugieren que la alta agregación de los cultivos desnitrificantes podría estar relacionada con la flotación de los lodos. Una predominancia de microorganismos desnitrificantes con alta capacidad de agregación y por ende de flotación de la biomasa podría explicar el efecto observado en los reactores.

### **Efecto de las condiciones de cultivo sobre la agregación**

Para poder determinar si diferentes condiciones de cultivo favorecen la flotación se realizaron ensayos de agregación utilizando diferentes relaciones C/N y diferentes sustratos. Los resultados mostraron que no se vio afectado el comportamiento de agregación de las cepas al variar la relación carbono nitrato del medio de cultivo. Estos resultados sugieren que la relación carbono/nitrógeno en la operación de los reactores no sería una causa de flotación de los lodos como fue sugerido por algunos autores (Cuervo-López, et al.1999). Sin embargo, es necesario hacer ensayos con la biomasa de los reactores para verificar si el comportamiento de los aislamientos refleja el comportamiento del lodo.

Con respecto al efecto del sustrato sobre la agregación se observó en dos de las 6 cepas analizadas un cambio de sus características de agregación al cambiar el sustrato. La cepa B158 presentó un resultado de agregación negativo cuando se utilizó como sustrato acetato, mientras que cuando el dador de electrones fue etanol, dicha cepa presentó un resultado de agregación positivo. Lo opuesto sucedió con la cepa M15 donde el resultado

de agregación fue positivo cuando se utilizó acetato como sustrato y negativo cuando la fuente de carbono fue etanol. Estos resultados están de acuerdo a los resultados obtenidos por Cuervo López et al. (1999). Estos autores reportaron que la fuente de carbono podría influir en la estabilidad de los lodos. Estos autores reportaron que al cambiar la fuente de carbono cambió la relación de proteínas/carbono de los EPS y las condiciones de flotación de los lodos. La utilización de diferentes sustratos podría entonces cambiar la composición de los EPS, siendo la composición de éstos responsable de los problemas de sedimentación.

Si bien en esta tesis se observó en algunos casos un cambio en los comportamientos de agregación debido al sustrato, no se puede concluir cuál de los dos sustratos utilizados sería el sustrato de elección ya que se obtuvo efectos de agregación tanto con acetato como con etanol. Habría que evaluar cada caso en particular para poder seleccionar el mejor sustrato.

### **Correlación entre actividad desnitrificante y agregación**

Los valores de actividad desnitrificante para las cepas estudiadas oscilaron entre 0,20  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$  hasta 29  $\mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$  cuando se utilizó acetato como fuente de carbono.

Estos valores son del orden de los reportados por otros autores. En el trabajo de Etchebere et al. (2001) se determinó la actividad desnitrificante de las bacterias predominantes en dos lodos obteniéndose valores de  $42,0 \pm 0,8 \mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$  y  $21,3 \pm 0,5 \mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$ . Utilizando acetato no se observó una relación entre el origen de las cepas (lodo del cual fue aislada) y la actividad.

Al utilizar etanol se observó un valor mayor para ambas cepas estudiadas M01  $92,1 \mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$  y B20  $29 \mu\text{moles N}_2\text{O/ min.mg proteína}$  respecto a los valores obtenidos con acetato como fuente de carbono. Estos resultados demuestran que al variar la fuente de carbono, algunas cepas cambian la velocidad de desnitrificación específica. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de Hallin et al. (2006) donde se observó diferentes velocidades de desnitrificación en lodos utilizando diferentes sustratos. Valores mayores de actividad se obtuvieron cuando se utilizó etanol y metanol como sustrato que cuando se utilizó, ácidos grasos, acetato y butirato. Este resultado es

importante a la hora de seleccionar el sustrato para operar un reactor, habrá que evaluar en cada caso que sustrato es conveniente para obtener una velocidad de desnitrificación aceptable junto con otras características de lodo del reactor que evite los problemas de sedimentación.

## **CONCLUSIONES**

No se encontró una relación entre el género de las cepas estudiadas y la flotación de la biomasa en cultivo líquido. Cepas pertenecientes al mismo género e incluso con el mismo perfil de ARDRA presentaron diferentes comportamientos de agregación.

En general, la capacidad de agregación de los aislamientos reflejaron las propiedades de flotación de los lodos. Se encontró una mayor proporción de cepas con ensayo de agregación positivo en el lodo M con malas propiedades de sedimentación.

En cuanto a las condiciones de crecimiento que favorecen la buena sedimentación se puede concluir que la relación C/N del medio de cultivo no tiene efecto sobre la sedimentación pero el tipo de sustrato sí. El efecto del sustrato no es generalizado sino que se da solo en algunas cepas. No es posible concluir cual sería el mejor sustrato ya que el efecto depende de la cepa. En algunos casos el acetato favorece la buena sedimentación y en algunos casos el etanol. Por lo tanto se debería estudiar en cada lodo cual sería el mejor sustrato para favorecer la buena sedimentación.

No se encontró en este trabajo con las cepas estudiadas una relación entre valores altos de actividad desnitrificante de las cepas y la mala sedimentación. Se descarta entonces que el efecto de la flotación este ligado a una mayor velocidad de producción de gas por los cultivos.

# **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**



## CONCLUSIONES FINALES

En la operación de los SBR desnitrificantes se debería buscar un equilibrio entre la biomasa y la cantidad de sólidos fijos de modo de evitar los problemas de flotación.

Una relación alta de P/C está asociada a una mala sedimentación de los lodos.

La relación carbón nitrato no afecta las propiedades de sedimentación sin embargo la elección del sustrato es muy importante para prevenir los problemas de mala sedimentación.

La mala agregación de los lodos no se debe a la abundancia en el lodo del reactor de un microorganismo afiliado a determinado género. La agregación es intrínseca de cada cepa y en algunos casos depende de la fuente de carbono utilizada.

Los lodos con mala agregación tienen mayor proporción de cepas con alta agregación.

Con las estrategias utilizadas se aislaron cepas desnitrificantes con una abundancia importante en las muestras analizadas.

## PERSPECTIVAS

**Determinar si existe una relación entre la composición de los ExoP de las cepas y las propiedades de sedimentación.**

Para ello se aislarán los ExoP de cepas con ensayo de agregación positivo y agregación negativo y con diferentes sustratos. Se realizará el estudio del perfil de los carbohidratos y de las proteínas de los ExoP extraídos.

**Establecer si existe una relación entre la hidrofobicidad y las propiedades de sedimentación de los lodos.**

Las burbujas de gas tiene menor volumen cuanto más hidrofílico sea el lodo y como consecuencia las burbujas pueden separarse mejor del lodo y evitar la flotación. Por otro

lado una reducción en la hidrofobicidad puede disminuir la energía libre de de adhesión del lodo y se tiende a formar grupos de gránulos con gas atrapados (Passeggi et al., 2004).

Se analizará la hidrofobicidad de las muestras de lodos y de cultivos puros mediante la técnica del ángulo de contacto según la técnica descrita en Passeggi y Borzacconi (2004).

### **El agregado de sólidos a los cultivos mejora las propiedades de sedimentación.**

Estudiar la agregación de diferentes cepas agregando carbonato de calcio o cloruro de calcio a los medios de cultivos ya utilizados. Según el trabajo de Beer et al.(1996) al agregar a los lodos carbonato de calcio aumenta la densidad del flóculo mejorando las propiedades de sedimentación.

### **Determinar si existe alguna correlación entre los T-RF y las propiedades de sedimentación de los lodos.**

Se realizará el T-RFLP del gen *nirS* y del gen ARNr 16S de las muestras de los reactores F y M. Estos resultados se compararán con los T-RF obtenidos para las muestras del reactor B.

Determinar si la propiedad de agregación se puede transmitir de una cepa a otra mediante compuestos excretados al medio.

Se realizará cultivos de cepas que presenten una alta capacidad de agregación y se extraerá el sobrenadante. Se esterilizará mediante filtración y se agregará a cultivos de cepas con baja agregación.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Allen M. S., Welch K. T., Prebyl B. S., Baker D. C., Meyers A. J., Sayler G. S. (2004) Analysis and glycosyl composition of the exopolysaccharide isolated from the flocc-forming wastewater bacterium *Thauera* sp. MZ1T Environ. Microbiol. 6 (8): 780-790.
- Beer D., O'Flaherty V., Thaveesri J., Lend P., (1996). Distribution of extracellular polysaccharides and flotation of anaerobic sludge .Appl Microbiol Biotechnol 46:197-201.
- Braker G., Ayala-del-Río H., Devol A., Fesefeldt A., Tiedje J.M. (2001) Community structure of denitrifiers, bacteria and Archaea along redox gradient in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*). Appl. Environ. Microbiol. 67: 1893-1901.
- Braker G., Fesefeldt A., Witzel K.P. (1998) Development of PCR primer system for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3769-3775.
- Burdman S., Jurkevitch, E., Schwartsburd B., Hampel M., Okon Y., (1998) Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factor and involvement of extracellular components. Microbiology, 144, 1989-1999
- Cabello P., Roldan MD., Moreno-Vivian C., (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. Microbiology 150:3527-3546
- Cabezas A. (2005). Microbiología de los procesos biológicos de nitrificación-desnitrificación en la descontaminación de desechos. Tesis de Maestría en Química, PEDECIBA-Facultad de Química-UDELAR
- Cabezas, A., Draper, P., Etchebehere, C., 2009. Fluctuation of microbial activities after influent load variations in a full-scale SBR: recovery of the biomass after starvation. Appl Microbiol Biotechnol 84:1191-1202
- Cescutti, P., Toffanin, R., Pollesello, P., Sutherland, P. 1999. Structural determination of the acidic exopolysaccharide produced by *Pseudomonas* sp. strain 1.15. Carbohydrate Res. 315: 159 -168.
- Chan Y-K., Barran Lr, Broomfield ESP. (1989) Denitrification activity of phage type representative of two populations of indigenous *Rhizobium meliloti* Can J Microbiol 35:737-740. Analysis for characterisation of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soil. FEMS Microbiol Ecol 34:121-128
- Cheneby D., Philippot L., Hartmann A., Henault C., Germon J.C (2000) 16S rDNA

- Chouari R., Le Paslier D., Daegelen P., Ginestet P., Weissenbach J., Sghir A., (2003). Molecular Evidence for Novel Planctomycete Diversity in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl. Environ. Microbiol*, 69: 7354–7363
- Cuervo-López F.M., Gómez J., (2004). Exopolymeric protein related to sludge settle ability in a denitrifying system. In *Proceedings of “Anaerobic Digestion”, 10th World Congress, Montreal, Canada, 29th August-2nd September, 4, 1912-1915.*
- Cuervo – Lopez F.M., Martinez F., Gutierrez-Rojas R., Noyola A., Gomez J., (1999). Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech* 40: 123-130.
- Dunbar,J., Ticknor L.O., Kuske C.R. (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 67: 190-197.
- Etchebehere C., Errazquin M. I., Dabert P., Moletta R. and Muxí L. (2001) Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *FEMS Microbiol Ecol* 35 (3): 259-265.
- Etchebehere C., Errazquin M.I., Cabezas A., Pianzola M.J., Mallo M., Lombardi P., Ottonello G., Borzacconi L., and Muxí L. (2002) Sludge bed development in denitrifying reactors using different inocula-performance and microbiological aspects. *Wat. Sci. Technol.*, 45 (10), 365-370.
- Etchebehere, C., (2007). *Ecología Microbiana y Ciclos Biogeoquímicos, en Tratamiento Biológico de Água Residuárias, Tribo de liha, pag 178-180.*
- Fang H.H.P., Jia X.S., 1996. Extraction of extracellular polymer from anaerobic sludge. *Biotechnol. Tech.* 10: 803-808.
- Ferrari A., Benitez A., Lema P., Irygoyen C., Gutierrez S., Travers D., Etchebehere E., (2005). Effect of the flocculant periodical addition on the performance of a sequential batch reactor treating dairy wastewater. *2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. Rio de Janeiro, Brasil.*
- Gamble TN., Betlach MR., Tiedje JM., (1997) Numerically dominant denitrifying bacteria from wold soil. *Appl Environ Microbiol* 33: 926-939
- Giuband G., Comete S., Bandu M., 2006. Relation between protocols for activated sludge extracellular polymeric substance (EPS) and EPS complexation properties. Part

- I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microb Technol* 38: 237 – 245.
- Goodwin J.A.S., Foster C.F., 1985. A further examination into the composition of activated sludge surface in relation to their settlement characteristic *Water Res.* 19: 527 – 533.
  - Gutiérrez,S., Ferrari A., Benítez A., Travers D., Menes J., Etchebehere C., Canetti R., (2006) Long term evaluation of a sequential batch reactor (SBR) treating dairy wastewater for carbon removal. 7th International Symposium on Waste Management problems in Agro-industries, Amsterdam, 27-29 September
  - Hallin S., Noredal I., Dicksved J., Pell M., (2006). Metabolic Profiles and Genetic Diversity of Denitrifying Communities in Active Sludge after Addition of Methanol or Ethanol *Appl Environ Microbiol* 72: 5445 – 5452.
  - Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2006). PAST - Palaeontological Statistics, ver. 1.53
  - Herbert H.P., Hong L., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludge. *J Biotechnol* 95: 249-256.
  - Heylen K., Vanparys B., Wittebolle L., Boon, N., De Vos P. (2006). Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study. *Appl Environ Microbiol* , 72: 2637-2643
  - Heylen K., (2007) Study of the genetic basis of denitrification in pure culture denitrifiers isolated from activated sludge and soil. Tesis de doctorado, Laboratorio de Microbiología, Departamento de Bioquímica, Fisiología y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Gent
  - Heylen K., Gevers D.,Vanparys, B., Wittebolle L., Geets J., Boon N., De Vos P. (2006). The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol* , 8: 2012 - 2021
  - Jenkins D., Richard M.G., Daigger G.T. (1993) *Manual on the causes and Control of Activated sludge bulking and foaming*. 2.ed. Lewis Boca Raton, Fla.
  - Jetten MSM., Logemann S., Muyzer, G., Roberston LA., de Vries S., Van Loosdrecht MCM., Kuenen JG., (1997) Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:75-93

- Kochert G. (1978). Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. In: J.A. Hellebust and J.S. Craigie (eds.), *Handbook of Physiological and Biochemical Methods*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 96-97).
- Kuenen JG., Roberson LA. (1998). Ecology of nitrification and denitrification. In: *the nitrogen and sulphur cycle*, Cole JA., Ferguson SJ (eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp 161-218.
- Kumar S., Tamara K., Nei M., (2004) MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Li X.Y., Yang S.F., 2007. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of active sludge. *Water Res.* 41: 1022 – 1030.
- Liao B.Q. Allen G.G., Droppo, L.G., Leppard G.G., Liss S.N., 2001. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Res.* 35: 339-350.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*; 193: 265-275.)
- Ma Swain B.S., Iveni R.L., Hausner M., Wilderer P.A., 2005. Composition and Distribution of extracellular Polymeric Substances in Aerobic Floc and Granular Sludge. *Appl Environ Microbiol* 71:1051-1057.
- Mahene I., Tiedje J.M., (1995) Criteria and Methodology for Identifying Respiratory Denitrifiers. *Appl Environ Microbiol* 61:1110-1115
- Martins A. M. P., Pagilla K., Heijnen J. J.van Loosdrecht M. C. M. (2004) Filamentous bulking sludge-a critical review. *Water Res.* 38: 793-817.
- Martins A.M.P., (1994). Bulking sludge control kinetics, substrate storage, and process design aspects. Tesis de doctorado, Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Aplicadas, Universidad de Delft.
- Morgan J.M., Foster C.F., Evison L.M., 1990. A comparison of extracellular biopolymers extracted from anaerobic and activated sludge. *Water res.* 6: 743-759.
- O'Hara GW., Daniel RM., (1995) Rhizobial denitrification: a review. *Soil Biol Biochem* 17:1-9
- Passeggi M. and Borzacconi L. (2004). Hydrophobicity and surface tension effect in anoxic sludge flotation. In *Proceedings of "Anaerobic Digestion"*, 10th World Congress, Montreal, Canada, 29th August-2nd September, 4, 1938-1941.

- Philippot L., 2002. Denitrifying genes in Bacterial and Archaeal genomes. *Biochem and Biophys. Acta* 1577: 355-376.
- Philippot L., (2005) Denitrification in pathogenic bacteria: for better or worst ? *Trends Microbiol* 13:191-192
- Poth M., Focht DD., (1995). N Kinetic analysis of N<sub>2</sub>O production by *Nitrosomonas europea*: an examination of nitrier denitrification. *Appl Environ Microbiol* 49:1134-1141.
- Quevedo M., Guynot E., Muxi L., (1996) Denitryfyng Potencial of Methanogenic Sludggle. *Biotechol Lett* 18: 1363-1368.
- Rajendhran, J., Gunasekan, P., 2010. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbial Res.* DOI 10.1016/j.micres.2010.02.003
- Ren T., Roy R., Knowles R., (2000). Production and consumption of nitric oxide by tree methanotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66:3891-3897.
- Risgaard- Petersen N., Langezaal AM., Ingvarlsen S., Schimid MC., Jetten MSM., Op den Camp HJM., Derksen JWM., Piña-Ochoa, Erikson SP., Nielsen LP., Revsbeeck NP., Ceghagen T., van der Zwaan GJ., (2006). Evidence of complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* 443:93-96.
- Shwa LJ., Nicol GW., Smith Z., Fear J., Prosser JL., Baggs EM., (2006) *Nitrosospira* spp. can produce nitrous oxide via nitrifier denitrification pathway. *Environ Microbiol* 8:214-222.
- Sekiguchi Y., Kamagata Y., Nakamura K., Ohashi A., Harada H., (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol.* 65:1280-8.
- Sekiguchi Y., Takahashi H., Kamagata Y., Ohashi A., Harada H., In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Dec;67(12):5740-9.
- Sheng-Jie You, Min Yi Lin. *Environmental Engineering Science.* November 2008, 25(9): 1301-1310. doi:10.1089/ees.2007.0239
- Schmidt I., van Spanning RJM, Jetten MSM., (2004) Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europea* wild type and nirK and NorB deficient mutants. *Microbiology* 150: 4107-4114.

- Lippel G. (2007). Reactores e Processos. en Tratamiento Biológico de Água Residuárias, Tribo de liha, pag 310-364.
- Speirs L., Nittami t., Mcllroy S., Schroeder S., Seviour R.J., (2009). Filamentous Bacterium Eikelboom Type 0092 in Activated Sludge Plants in Australia Is a Member of the Phylum *Chloroflexi*. *Appl Environ Microbiol*. 75: 2446–2452
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995). 19th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Tiedje JM., (1998) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Environmental microbiology of anaerobes, A.J.B., Zehner (ed) John Wiley & Sons, New York, 179-244.
- Tielens AGM., Rotte C., van Hellemond JJ, Martin W., (2002). Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci* 27:564-572.
- Travers D., (2008). Reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales. Maestría en Microbiología aplicada a las ciencias ambientales, Facultad de Ciencias - UDELAR
- Varinhos F., Wallece W., Nicholas DJD, (1989) Simultaneous assimilation and desnitrification of nitrate by *Bradyrhizobium japonicum* *J Gen Microbiol* 135:189-193
- Veiga M.C., Mahendra K.J., Wu W.M., Hollingsworth R.I., Zeikus J.G., 1997. Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granular. *Appl Environ Microbiol* 63: 403-407.
- Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C., (1999) Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization Structure and Function. Spring- Verlag, Berlin Heidelberg Capitulo 3.
- Weier KL., MacRae IC., (1992) Denitrifying bacteria in the profile of a brigalow clay soil beneath a permanent pasture and a cultivated crop. *Soil Biol Biochem* 24:919-923
- Zhou J., Fries MR., Chee-Sanford JC., Tiedje JM., (1995) Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 45:500-506.
- Zumft W.G. (1997) Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 61:533–616.

# **ANEXOS**



## ANEXO 1: Determinación de proteínas por LOWRY

Preparar las siguientes soluciones:

**Solución A:** Carbonato de sodio al 2 % en NaOH 0.1N.

Pesar 2 g de carbonato de calcio y llevarlo a 100 mL con una solución de NaOH 0.1 N

**Solución B:**  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 % en 1 % de Tartrato de sodio

Pesar 0,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 1 g de tartrato de sodio. Agregar agua hasta completar un volumen de 100 mL

**Solución D:** Reactivo de Folin diluido al tercio.

Realizar una dilución al tercio del reactivo de folin.

**Solución C:** 50 mL de sol A y 1 mL de sol B

Prepararla al momento de realizar la determinación.

### Procedimiento

1. Colocar en tubo de vidrio 0.2 mL de la muestra.
2. Agregar 1 mL de la solución C
3. Incubar 10 minutos agitando a temperatura ambiente
4. Agregar 0.3 mL de sol D
5. Incubar 30 minutos
6. Medir la absorbancia a 750nm.

Realizar la curva de calibración cada vez que se prepara el reactivo C con Sero Albúmina Bovina.

## **ANEXO 2: Determinación de azúcares por técnica fenol sulfúrico**

Realizar una curva de calibración con las siguientes soluciones de maltosa: 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL.

### **Procedimiento:**

1. En tubo de vidrio de aproximadamente 10 cm con tapa rosca colocar por duplicado 0.9 mL de muestra o estándar
2. Agregar 0.45 mL de solución de Fenol
3. Agregar 2,0 mL de ácido sulfúrico
4. Agitar en vortex
5. Colocar los tubos en un baño de agua a 80 °C durante 30 minutos
6. Una vez que lleguen a temperatura ambiente medir la absorbancia a 480nm.

## **ANEXO 3: Determinación de azúcares por Di-Nitro Salicílico (DNS)**

1. En un tubo de microcentrífuga se colocan 100 µl de muestra
2. Se agrega 100 µl de solución de DNS
3. Se calienta durante 5 minutos a ebullición
4. Luego se enfría en agua fría
5. Agregar 3.8 mL de agua y medir la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro.

### **PREPARACION DE DNS (Ácido 3, 5 dinitrosalicílico):**

1. Pesar 30 gr de Tartrato de sodio y 1,6 gr de hidróxido de sodio.
2. Agregar 50 mL de agua y calentar.
3. Una vez que este disuelto agregar 1 gr de DNS.
4. Enrasar con agua hasta 100 mL

## **ANEXO 4: PROTEIN ASSAY REAGENT (BCA)**

### **Preparar el reactivo C al momento de usarlo:**

50mL de reactivo A: Acido Bicinconínico (BCA)

1mL de reactivo B: Solución de sulfato de cobre al 4%

**Procedimiento:**

Colocar en un eppendorf:

- 100 uL de la muestra
- 1 mL de reactivo C
- Incubar a 60 °C 15 minutos
- Enfriar en baño de agua
- Medir la Absorbancia a 562 nm

**ANEXO 5: Medio de cultivo BCY**

Para 500 mL pesar y colocar en un matraz adecuado:

- $K_2HPO_4$ ..... 2.65 g
- $KH_2PO_4$ .....1.33 g
- Extr. Levadura..... 0.25 g
- $NH_4Cl$ .....0.50 g
- Solución de Minerales..... 2.50 mL
- $Na_2S$ ..... 0.10 mL
- Rezarsurina.....0.50 mL de solución 0.2%
- $KNO_3$ ..... 0.36 g
- $H_2O$ ..... 500 mL
- $NaCl$ ..... 2.9 g

Dejar hervir. Enfriar con gaseado de  $N_2$  y agitación. Controlar pH 7. Fraccionar.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Antes de usar suplementar el medio con 0.2 mL de una solución de CaMg y con 0,1 mL de vitaminas en forma aséptica.

**Solución de CaMg:**

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$  .....11,6 g/L

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ .....3,72 g/L

**Solución de minerales:**

Ácido Nitriloacético	12,8 g/L
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,35 g/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0024 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	0,1 g/L
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g/L
Molibdato de Na.2H <sub>2</sub> O	0,024 g/L
NaCl	1,0 g/L
NaS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,026 g/L
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,12 g/L

Agregar el ácido nitriloacético en 200 mL de agua destilada, ajustar el pH a 6,5 con KOH 10N. Verter esta solución en 600 mL de agua. Disolver los compuestos en ese orden. Llevar a 1 litro y guardar bajo N<sub>2</sub>

**Solución de Vitaminas:**

Biotina	2,0 mg/L
Ácido Fólico	2,0 mg/L
Piridoxina.HCl	10,0 mg/L
Tiamina.HCl	5,0 mg/L
Riboflavina	5,0 mg/L
Ácido Nicotínico	5,0 mg/L
DL-Pantotenato	5,0 mg/L
Cianocobalamina	0,1 mg/L
Paraaminobenzoico	5,0 mg/L
Ácido Tioctico	5,0 mg/L

## ANEXO 6: ARDRA

### a- PCR

#### 1) Master mix

En un tubo eppendorf colocar los siguientes reactivos por reacción de PCR que se quiera realizar.

Agua	15,25 µL
Buffer 10X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µL
BSA	0,25 µL
dNTP mix (2,5 mM c/u)	2 µL
16S - 27F (10 mM)	1 µL
16S – 1492R (10 mM)	1 µL
Taq	0,5 µL

2) Repartir la master mix en tubos eppendorf colocando 24 µL en cada uno, realizar un slip con centrifuga y colocar 1 µL de ADN o de lisis celular.

3) En el termociclador realizar el siguiente ciclo:

94 °C 5min.

30 ciclos (94 °C 1min + 55 °C 1min + 72 °C 3min)

72 °C 7 min + 4 °C 10 min

### b- RESTRICCIÓN

1) En un tubo eppendorf colocar los siguientes reactivos por reacción de PCR que se quiera digerir.

Agua	15,8 µL
Buffer 10X	3,0 µL
<i>Hae</i> III	0,6 µL
<i>Hha</i> I	0,6 µL

2) Colocar en un eppendorf 20 µL de la mix anterior y 10 µL del producto de PCR a digerir.

3) Incubar a 37 °C en baño de agua durante 12 horas.

#### **c- PREPARACION DEL GEL**

- 1) Enfriar TBE recién preparado en la heladera.
- 2) Pesar la agarosa Methaphor (2,8 g para 80 mL).
- 3) Agregar de a poco agitando bien.
- 4) Dejar hidratar por 15 minutos en la heladera.
- 5) Fundir en microondas de a 30 segundos a potencia 30.
- 6) Volcar en bandeja.
- 7) Dejar enfriar.
- 8) Guardar en la heladera por 12 horas.

#### **d- CORRIDA DE ELECTROFORESIS**

- 1) Mezclar 30 µL de la restricción con 4 µL de loading buffer.
- 2) Sembrar esta mezcla en los pocillos del gel.
- 3) Sembrar en otro pocillo 15 µL del marcador de peso molecular.
- 4) Correr el gel a temperatura ambiente a 120V hasta que el marcador llegue al final del gel
- 5) Tefir con bromuro de etidio (10 µL en 200 mL de agua) durante 30 minutos.
- 6) Enjuagar con agua.
- 7) Observar al UV, sacar foto, analizar con GelCompar.

#### **ANEXO 7: Lisis alcalina de células**

- Colocar en un tubo eppendorf 10 uL de una suspensión de células ( $10^2$  -  $10^7$ )
- Agregar 100 uL de NaOH 0.05 M.
- Incubar a 95 °C 15min
- Centrifugar 2 min a 14.000 rpm
- Separar el sobrenadante

**ANEXO 8: Secuencias de los primers utilizados**

Nombre del primer	secuencia
nirS 1F	5'- CCT AYT GCC CGC CRC ART-3'
nirS 6R	5'- CGT TGA ACT TRC CGG T-3'
nirK 1F	5'- GGM ATG GTK CCS TGG CA-3'
nirK 5R	5'- GCC TCG ATC AGR TTR TGG-3'
16S- 27F	5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'
16S- 1492 R	5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT-3'
nirS 1F LAB	5'- /56 FAM/- CCT AYT GCC CGC CRC ART-3'
16S- 27F LAB	5'- /56 FAM/-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

**ANEXO 9: Amplificación del gen *nirS* y *nirK******nirS***

1- Colocar en un tubo eppendorf los siguientes reactivos:

H <sub>2</sub> O	17.5
Buffer 10x	2.4
MgCl <sub>2</sub>	1.25
BSA	0.25
DNTP	2
nirS 1F (10 µM)	0.5
nirS 6R (10 µM)	0.5
Taq pol	0.25

2- Agregar 1 µL de ADN

3- Colocar el tubo eppendorf en el termociclador con el siguiente ciclo:

1. 95°C 5 minutos
2. 95°C 30 seg + 56°C 40 seg + 72°C 40 seg (se repite este ciclo 10 veces bajando la temperatura de annealing 0,5°C en cada ciclo hasta completar 10 ciclo con lo cual se llega a una temperatura de 51°C)

3. 95°C 30 seg + 54°C 40 seg + 72°C 40 seg (este ciclo se repite 25 veces)
4. 72°C 7 minutos + 4°C hasta sacar los productos de PCR del termociclador.

### **nirK**

- 1- Colocar en un tubo eppendorf los siguientes reactivos:

H <sub>2</sub> O	17.5
Buffer 10x	2.4
MgCl <sub>2</sub>	1.25
BSA	0.25
DNTP	2
nirK 1F (10 µM)	0.5
nirK 5R (10 µM)	0.5
Taq pol	0.25

- 2- Agregar 1 µL de ADN
- 3- Colocar el tubo eppendorf en el termociclador con el mismo ciclo amplificar el gen *nirS*

## **ANEXO 10: T-RFLP del gen del ARNr 16S**

### Pasos generales del procedimiento:

- 1) Extraer ADN (utilizando el Soil DNA extraction kit, MoBio)
- 2) PCR
- 3) Purificación del producto de PCR (kit Qiagene)
- 4) Corte con enzimas de restricción
- 5) Concentración con etanol
- 6) Separación de los fragmentos en secuenciador automático
- 7) Análisis perfiles

### **2) PCR del gen del ARNr 16S**

- 2.1 Para una reacción de 50 µl colocar en un tubo eppendorf

reactivo	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	31.5
Buffer 10x	5
MgCl <sub>2</sub>	3
BSA	0.5
DNTP	4
27F lab (10 µM)	2
1492 R (10 µM)	2
Taq pol	1

2.2 Agregar 1µl de ADN

**Ciclo en termociclador:**

94 °C 5min

30 ciclos (94 °C 1min + 55 °C 1min + 72 °C 3min)

72 °C 7 min + 4 °C 10 min

### 3) Purificación por gel (kit Qiagene)

Juntar 2 PCR de 100 µl y purificar las con el Kit PCR purification kit de Qiagene. Eluir con 30 µl de agua MQ estéril.

### 4) Corte con enzimas de restricción

4.1 Colocar en tubos de microcentrífuga separados las dos digestiones para cada enzima según se indica a continuación:

*Hha*l por reacción:

Reactivo	Volumen(µL)
DNA	15
Buffer	2
BSA	0.2
<i>Hha</i> l	0.6
H <sub>2</sub> O	2.2

*Mspl* por reacción:

Reactivo	Volumen( $\mu$ L)
DNA	15
Buffer	2
<i>Mspl</i>	0.6
H <sub>2</sub> O	2.4

4.2 Incubar a 37 °C toda la noche en baño de agua.

4.3 Inactivar las enzimas colando los tubos eppendorf en baño de agua a 65 ° C durante 10 minutos.

### **5) Concentración y purificación de los fragmentos**

5.1 Agregar 4 volúmenes de EtOH (64 mL EtOH puro +16 mL H<sub>2</sub>O) e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos.

5.2 Centrifugar 30 minutos a máxima velocidad

5.3 Sacar el sobrenadante con pipeta

5.4 Lavar con 100  $\mu$ l de EtOH 70 % durante 10 minutos

5.5 Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad

5.6 Sacar el sobrenadante con pipeta

5.7 Secar en estufa 8 minutos (o hasta que no quede seco) a 50 °C

### **6) Separación de los fragmentos por electroforesis capilar en secuenciador automático (Realizado en el servicio de secuenciación de la Facultad de Ciencias o en el Instituto Pasteur de Montevideo)**

6.1 Colocar en un eppendorf sin guantes:

- 2  $\mu$ L de digestión

- 2  $\mu$ L formamida

- 0.5  $\mu$ L de estándar

- 0.75  $\mu$ L de LB (loading buffer)

6.2 Desnaturalizar a 95 °C durante 2 minutos

6.3 Colocar en hielo rápidamente

6.4 Cargar con 2  $\mu$ L de cada muestra en el secuenciador.

## ANEXO 11: T-RFLP del gen *nirS*

### Pasos generales del procedimiento:

1. Extraer ADN (utilizando el Soil DNA Extraction Kit MoBio)
2. PCR
3. Concentrar por precipitación con Etanol
4. Purificación por gel
5. Corte con enzimas de restricción
6. Concentrar por precipitación con Etanol
7. Separación de fragmentos en secuenciador automático.
8. Análisis perfiles

### **2) PCR del gen *nirS***

2.1 Para una reacción de 50  $\mu$ L colocar en un tubo eppendorf

	$\mu$ L
H <sub>2</sub> O	34.5
Buffer 10x	5
MgCl <sub>2</sub>	2.5
BSA	0.5
DNTP	4
Nir F lab (10 $\mu$ M)	1
Nir R (10 $\mu$ M)	1
Taq pol	0.5

2.2 Agregar 1  $\mu$ L de ADN

2.3 Colocar los tubos eppendorf en el termociclador y realizar el mismo ciclo del Anexo 9.

### **3) Concentrar el producto de PCR**

Juntar 4 PCR = 180-200  $\mu$ L y concentrar hasta 20-30  $\mu$ L para ello:

- 3.1 Agregar 4 volúmenes de EtOH (64 mL EtOH puro +16 mL agua) Incubar en oscuridad a temperatura ambiente 30 minutos.
- 3.2 Centrifugar 30 minutos a máxima velocidad
- 3.3 Sacar el sobrenadante con pipeta

- 3.4 Lavar con 100  $\mu$ L de EtOH 70 % durante 10 minutos
- 3.5 Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad
- 3.6 Sacar el sobrenadante con pipeta
- 3.7 Secar en estufa 8 minutos (o hasta que no quede secos) a 50 °C

#### **4 ) Purificación por gel**

4.1 Para prepara un gel de 150 mL ( 0.8%) de agarosa seguir las siguientes instrucciones:

- 4.1.1 Pesar 1.2 g de agarosa low melting
- 4.1.2 Agregar 150 mL de TBE 1X recién preparado.
- 4.1.3 Fundir la agarosa con agitación.
- 4.1.4 Poner la agarosa fundida en soporte adecuado con peine grande

#### 4.2 Siembra del gel:

- 4.2.1 Agregar 5  $\mu$ L de LB (loading buffer) al DNA y sembrar 35  $\mu$ L (todo) en los pozos del medio no en las puntas dejando un pozo libre entre medio.
- 4.2.2 Sembrar 10  $\mu$ L del marcador 1Kb
- 4.2.3 Correr a 100 V en heladera (1.5 hs –2)
- 4.2.4 Teñir con bromuro de etidio.
- 4.2.5 Lavar con agua destilada

#### 4.3 Cortar banda:

- 4.3.1 Pesar los eppendorf a usar
- 4.3.2 Cortar las bandas y con espátula limpia poner en el eppendorf previamente pesado
- 4.3.3 Pesar el eppendorf mas la banda y calcular el peso de la banda
- 4.3.4 Usar el kit Quiagene (extracción del gel) según instructivo brindado por el fabricante.

## 5) Corte con enzimas de restricción

5.1 Colocar en un tubo eppendorf los siguientes reactivos y ADN:

*Hha*I por reacción:

DNA	15 µl
Buffer	2
BSA	0.2
<i>Hha</i> I	0.6
H <sub>2</sub> O	2.2

*Msp*I por reacción:

DNA	15 µl
Buffer	2
<i>Msp</i> I	0.6
H <sub>2</sub> O	2.4

5.2 Incubar a 37 °C toda la noche

5.3 Finalizada la incubación inactivar las enzimas colocando los eppendorf con las restricciones en baño de agua a 65 °C durante 10 minutos.

## 6) Concentración de los fragmentos

6.1 Agregar 4 volúmenes de EtOH (64 mL EtOH puro +16 mL agua) e incubar en oscuridad a temperatura ambiente 30 minutos.

6.2 Centrifugar 30 minutos a máxima velocidad

6.3 Sacar el sobrenadante con pipeta

6.4 Lavar con 100 µL de EtOH 70 % durante 10 minutos

6.5 Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad

6.6 Sacar el sobrenadante con pipeta

6.7 Secar a temperatura ambiente.

## 7) Separación de los fragmentos por electroforesis capilar en secuenciador automático (Realizado en el servicio de secuenciación de la Facultad de Ciencias o en el Instituto Pasteur de Montevideo)

7.1 Colocar en un eppendorf sin guantes:

- 2µL de digestión
- 2 µL formamida
- 0.5 µL de estándar
- 0.75 µL de LB (loading buffer)

7.2 Desnaturalizar a 95 °C durante 2 minutos

7.3 Colocar en hielo rápidamente

7.4 Cargar con 2 µL de cada muestra el gel

### **ANEXO 12:** Determinación de la actividad desnitrificante de cultivos puros.

1. Se hace crecer la cepa a ensayar en una placa de TSA para verificar la pureza de la misma. Se hace una tinción de Gram y se mira al microscopio.
2. Se realiza una suspensión de la cepa en suero fisiológico, se inocula un vial con BCY con atmósfera de N<sub>2</sub> y se incuba con agitación a 35 -37 °C. Se comienza inoculando un vial con 10 mL de medio. De estos 10 mL, a las 24 horas, se usan 5 mL para inocular un vial con 50 mL de medio fresco. Nuevamente, se esperan otras 24 horas, para inocular un frasco con septa que contenga 400 mL de medio con 40 mL de inóculo anterior.
3. Luego de 24 horas de incubación, las células son recogidas por centrifugación a 10000 rpm durante 10 min y a 10 °C. Se realizan tres lavados con buffer fosfato 50 mM (pH 7.0), el cual contiene cloramfenicol en una concentración 200 µg/mL. Las células se resuspenden en 4-6 mL de del mismo buffer. Las células lavadas se guardan a 4 °C, por hasta 24 horas, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>.
4. Se procede a la cuantificación de proteínas para la determinación de la biomasa. La suspensión bacteriana se analiza por el método de Lowry, luego de una digestión alcalina (\*).

5. El vial conteniendo la suspensión bacteriana se agita con agitador magnético, bajo corriente de  $N_2$ . Se toma un volumen de suspensión bacteriana tal que contenga entre 0.7–1.5 mg de proteínas. Es conveniente que el volumen a tomar sea cercano a 1 mL para disminuir las posibles causas de error por mala homogeneización de la suspensión. Si es necesario se realiza una dilución de la suspensión con el buffer fosfato 50 mM (pH 7.0), que contiene cloramfenicol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$
6. El ensayo se realiza en viales de 10 mL, cuyo volumen total fue exactamente determinado. El vial vacío, se coloca bajo corriente de  $N_2$ , por algunos minutos. Se le agrega el volumen de la suspensión de células, que contiene cloramfenicol en una concentración 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Además, se agrega buffer fosfato 50 mM (pH 7.0) tal que el volumen final sea de 4 mL y la cantidad de cloramfenicol sea de 400  $\mu\text{g}$ .
7. El vial que contiene la mezcla de reacción se agita con agitador magnético, bajo corriente de  $N_2$  por unos 10 minutos. Luego se tapa, con tapón de goma y se precinta. Se agrega acetileno, tal que sea el 10 % del headspace. (aproximadamente 6 mL).
8. A tiempo cero se le agrega en forma simultánea, con jeringas separadas y con agitación continua, 0.2 mL  $\text{KNO}_3$  20 mM y 0.2 mL de acetato de potasio 40 mM.
9. Se deja de cinco a diez minutos y se saca la primera muestra con una jeringa gas tight de 1mL. Se inyecta en el GC.
10. Según el tamaño del área se saca una muestra rápidamente o se espera más tiempo.

El área se correlaciona con una cantidad de  $N_2O$  en  $\mu\text{moles}$ , que se determina mediante una curva de calibración.

## Cálculos

$$\mu\text{moles de N}_2\text{O total} = \frac{\mu\text{moles de N}_2\text{O inyectados} \times (\text{vol headspace} + \text{vol liq} \times \alpha)}{\text{Volumen de inyección}}$$

Siendo  $\alpha$  el coeficiente de solubilidad

$$\alpha = 0.632 \text{ (T=20°C)}$$

$$\alpha = 0.544 \text{ (T = 25°C)}$$

(\*) Digestión alcalina:

- 1- se colocan en un eppendorf 200-400 mL de la suspensión bacteriana.
- 2- Se agrega 1 mL de NaOH 1N.
- 3- Se calienta a 90 °C por 10 min.

