

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**DETERMINACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA
EN BIORREACTORES MEDIANTE TÉCNICAS DE
BIOLOGÍA MOLECULAR**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:
Q.F.B. JOSÉ ANTONIO VELÁZQUEZ ARAGÓN**

COMITÉ TUTORIAL:

**DIRECTOR: Dr. HUGO CÉSAR RÁMIREZ SAAD
ASESORES: Dr. ÓSCAR MONROY HERMOSILLO
Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL
Dr. EDMUNDO BONILLA**

JURADO:

**Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL
Dr. ALEJANDRO OLMOS DICHARA
Dr. CÉSAR HUGO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT No. de Registro 309-0 y PIFOP CONACyT clave C/NPFPN-2002-35-32.

Se agradece también el apoyo de CONACyT por la beca de estudios de posgrado otorgada a José Antonio Velázquez Aragón No. 162748 y el apoyo financiero a través del Proyecto B33584.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Determinación de la comunidad microbiana en biorreactores mediante técnicas de biología molecular”

PRESENTÓ

Q.F.B. José Antonio Velázquez Aragón

Director:

Dr. Hugo César Ramírez Saad
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Asesor:

Dr. Óscar Monroy Hermosillo
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor:

Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor:

Dr. Edmundo BonillaGonzález
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Jurado:

Dr. Octavio Loera Corral (Presidente)
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Alejandro Olmos Dichara (Secretario)
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. César Hugo Hernández Rodríguez (Vocal)
*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional*

“...levanto mi vaso por la terrible verdad
que no se puede revelar a los oídos de la juventud,
excepto que nada vale un carajo...”
L.. Cohen. *Closing time*

Dedicado a Nadia con amor.

Agradecimientos:

A Eloína la “Ge” y Claudio (Gracias a ustedes estoy aquí).

A Luis, Gabriela, Claudia, Patricia, Francisco y Nelly.

A mis amigos.

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	iii
I. Introducción	1
1.1 Aguas residuales	2
1.2 Eliminación de nitrógeno de aguas residuales	2
1.2.1 Ciclo del Nitrógeno	2
1.2.2 Métodos fisicoquímicos para la eliminación de amonio y nitrato	4
1.2.3 Métodos biológicos para la eliminación de amonio y nitrato	5
1.2.3.1 Nitrificación	5
1.2.3.2 Desnitrificación	12
2. Monitoreo de las comunidades bacterianas en plantas de tratamiento de aguas	22
2.1 Técnicas clásicas para el estudio de comunidades microbianas en plantas de tratamiento de agua	22
2.2 Técnicas quimiotaxonómicas de monitoreo	24
2.3 Identificación de bacterias por inmunofluorescencia	24
2.4 Técnicas de monitoreo basadas en ácidos nucleicos	25
2.5 Monitoreo de la diversidad microbiana por análisis de DGGE del 16S rDNA	28
3. Tipificación de bacterias por análisis del espacio intergénico transcrito (ITS)	30
4. Aplicación de técnicas de biología molecular para el estudio de la desnitrificación en aguas	31
II. Justificación	33
III. Objetivos	35
IV. Materiales y Métodos	37
4.1. Operación de los reactores	38
4.2. Toma de muestras	39
4.3. Aislamiento de cepas desnitrificantes	39

4.4. Extracción de DNA de cepas desnitrificantes	40
4.5. Tipificación de los aislados desnitrificantes por amplificación del ITS y su digestión con enzimas de restricción	40
4.6. Identificación de los aislados desnitrificantes	40
4.7. Extracción de DNA de muestras de lodo de los reactores	40
4.8. Amplificación del gen 16S y del fragmento V6-V8 por PCR	41
4.9. Separación de los amplicones de las cepas y de las comunidades bacterianas de los reactores por DGGE	42
4.10. Determinación amonio	42
4.11. Determinación nitrato	42
4.12. Dinámica de crecimiento de los aislados desnitrificantes bajo condiciones de laboratorio	43
4.13. Análisis estadístico	43
V. Resultados y Discusión	44
5.1 Aislamiento, caracterización e identificación de cepas desnitrificantes	45
5.2 Crecimiento de las cepas desnitrificantes	48
5.3 Capacidad de consumo de nitrato de las cepas obtenidas	49
5.4 Estructura de las comunidades bacterianas de los reactores y sus cambios en función del tiempo y las condiciones de operación	50
5.4.1 Reactor nitrificante	50
5.4.2 Reactor desnitrificante	53
5.5 Identificación de los aislados desnitrificantes dentro de la comunidad bacteriana del reactor	56
VI. Conclusiones	60
VII. Bibliografía	62
VIII. Anexos	71

RESUMEN.

Las aguas residuales son productos de desecho tanto doméstico, como de procesos industriales, las cuales contienen contaminantes que pueden tener un grave efecto sobre el ambiente al cual son descargadas, o sobre la salud de animales y humanos (Amman, 1998). Entre los principales contaminantes de las aguas residuales se encuentran los compuestos inorgánicos de nitrógeno como amonio, nitrato y nitrito (Cervantes, 2000).

La nitrificación biológica es la oxidación del amonio a nitrito y posteriormente a nitrato por medio del metabolismo de dos grupos de bacterias conocidas como; oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito (Kowalchuk, 1999). Este proceso a sido ampliamente utilizado para tratar aguas residuales con altas concentraciones de amonio. La desnitrificación es el proceso por el cual el nitrato es reducido a nitrógeno molecular por bacterias desnitrificantes, proceso que también ha sido aprovechado para tratar aguas residuales (Bothe, 2000).

El estudio de las dinámicas de las poblaciones bacterianas dentro de reactores de tratamiento de aguas se realizó hasta hace una década y media, por medio de microbiología clásica, lo cual a la luz de nuevas técnicas desarrolladas muestran que estas pueden tener sesgos ya que no mostraban el total de las bacterias presentes en este tipo de ambientes (Wagner, 1993). Las técnicas de biología molecular han ampliado el conocimiento que tenemos sobre la composición, la estructura y la dinámica de las comunidades bacterianas de medios complejos como son los lodos activados (Amman, 1998).

En el presente trabajo fueron estudiados los cambios en composición y estructura de las comunidades bacterianas presentes en dos reactores de tratamiento de aguas trabajando en serie, uno nitrificante y otro desnitrificante. Dichos cambios estuvieron relacionados a las condiciones de operación en, y se documentaron en base la técnica conocida como DGGE (Muyzer, 1993). Así mismo, se investigó la importancia de algunos aislados desnitrificantes, dentro de su comunidad.

Fue posible aislar seis cepas diferentes de bacterias desnitrificantes las cuales fueron identificadas por galerías API como: *Chryseomonas luteola*, *Alcaligenes*

xylosoxidans, *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Acinetobacter johnsonii*. Una de ellas no pudo ser identificada y fue nombrada cepa Dsn1. Los aislados tuvieron una velocidad de crecimiento similar en medio desnitrificante, pero la cepa de *C. luteola* mostró un consumo de nitrato mayor que el resto.

Las comunidades bacterianas de ambos reactores mostraron ser muy estables durante el tiempo mientras las condiciones de operación fueron constantes y con cargas de amonio o nitrato moderadas. El reactor nitrificante presentó cambios en los perfiles de su comunidad bacteriana, relacionados al aumento de la concentración de amonio. Como la eficiencia del reactor era baja (25%), se efectuaron cambios en la operación, aumentando la aireación y después de un periodo de adaptación se observó un aumento en la eficiencia (95%), que estuvo acompañado por un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana. El reactor desnitrificante también presentó cambio en los perfiles de su comunidad bacteriana una vez que la concentración de nitrato aumentó, así mismo presentaba una baja eficiencia de remoción de nitrato (30%), después de los ajustes realizados al sistema de reactores se observó paulatinamente una mejora en la eficiencia del reactor hasta alcanzar un 75% al final de este estudio. Sin embargo, el perfil de la comunidad permaneció sin cambios con respecto al inicio de la carga alta de nitrato, lo que aporta evidencia al hecho de que puede existir una adaptación paulatina de la comunidad a las condiciones y un aumento de la biomasa total presente en el reactor, sin que exista un cambio en la estructura de la comunidad.

De las seis cepas desnitrificantes aisladas sólo Dsn1 mostró una coincidencia con una banda importante del perfil de la comunidad desnitrificante, durante el periodo en que el reactor manejaba concentraciones medias de nitrato, sin embargo esta banda desapareció del perfil una vez que se aumentó la concentración de nitrato, pero entre las bandas que aumentaron su tamaño en estas condiciones se encontró una que coincidía con la banda obtenida para la cepa *Alcaligenes xylosoxidans* indicando que probablemente esta cepa en condiciones de concentraciones altas de nitrato tiene una presencia importante, lo cual la hace probablemente una de las cepas responsables de la desnitrificación dentro del reactor.

ABSTRACT

Wastewater treatment is one of the most important environmental issues for this century, ammonia and nitrate are among the most common water contaminants. Nitrification and denitrification are biological processes done by bacteria that oxidize ammonia to nitrate and nitrate to molecular nitrogen on different sources (soil, fresh and marine water) and have been used in wastewater treatment reactors to eliminate these compounds.

In this work we followed microbial community changes in time and at different ammonium and nitrate concentrations in two wastewater treatment reactors (nitrificator and denitrificator) by PCR based Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and the correlation between community profiles and the efficiency of the reactors, also we observed the importance of six denitrificator isolated strains within their community by the same technique.

On both reactors there was no change on the community profiles while they work at low ammonium charge and nitrate (around 50 ppm) but when the charge increased (around 100 ppm) there were important changes on community profiles. Nitrificator reactor at the beginning of high loads of ammonium had a poor efficiency (25%) and it was correlated to a defined community profile, when more air was pumped to the reactor efficiency increased to good removal rates (95%) and a change on the community profile was observed. Denitrificator reactor efficiency was low at initial high nitrate charges (30%) but this efficiency increased in time to reach 75%, changes on community profiles were not detected, this is the first report where a change on efficiency is not correlated to a change on community profile.

Only one not identified isolated strain (named Dsn1) appears as a relevant band on denitrificator reactor community profiles at nitrate 50 ppm but when concentration increased and community had changed this band disappeared and a new relevant band showed a correspondence with a *Alcaligenes xiloxidans* isolated strain making it interesting for bioaugmentation studies.

Key words: Nitrification, denitrification, DGGE.

I. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 AGUAS RESIDUALES.

El incremento en la utilización de los recursos naturales, relacionado con el aumento de la población mundial y su necesidad de obtener satisfactores, ha obligado a buscar la manera de aprovechar mejor los recursos y de ser posible reutilizarlos. La capacidad para manejar los desechos y reaprovecharlos, así como controlar la contaminación causada por las actividades humanas será, a la larga, crucial para el desarrollo de la humanidad, en donde el mejor manejo del agua es uno de los de los mayores problemas a resolver.

Las aguas residuales son aguas sucias producidas una vez que se ha utilizado agua para cualquier proceso. Las industrias, así como los hogares, producen aguas residuales derivadas de diferentes procesos y con diferencias en sus características, por lo cual se clasifican por su origen, en aguas residuales industriales y domésticas. Algunas aguas residuales están contaminadas con compuestos químicos cuya presencia puede tener un grave efecto sobre el ambiente donde son descargadas o sobre la salud del hombre y los animales. El tratamiento de aguas residuales es el proceso utilizado para la eliminación de contaminantes en el agua (Amann, 1998).

Dentro de los principales compuestos contaminantes del agua se encuentran los compuestos orgánicos como hidrocarburos, compuestos inorgánicos altamente tóxicos, como los metales pesados y compuestos inorgánicos medianamente tóxicos como los compuestos de nitrógeno. Sobre estos últimos se estima que en los últimos 100 años, la actividad humana ha duplicado la cantidad de compuestos de nitrógeno como nitratos y amonio en el globo terrestre, debido principalmente a las industrias química y agroquímica (Breemen, 2002). En consecuencia, el nitrógeno en sus distintas formas ha contribuido a la contaminación atmosférica, de suelos y de cuerpos de agua.

1.2 ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS DE NITRÓGENO DE AGUAS RESIDUALES.

1.2.1 Ciclo del nitrógeno.

El nitrógeno está presente en la naturaleza en numerosos estados de oxidación, la interconversión entre estos estados es predominantemente biológica. De manera

general, el ciclo de este elemento (Figura 1.1) empieza con el proceso de fijación de nitrógeno molecular y es regresado a la atmósfera mediante la desnitrificación.

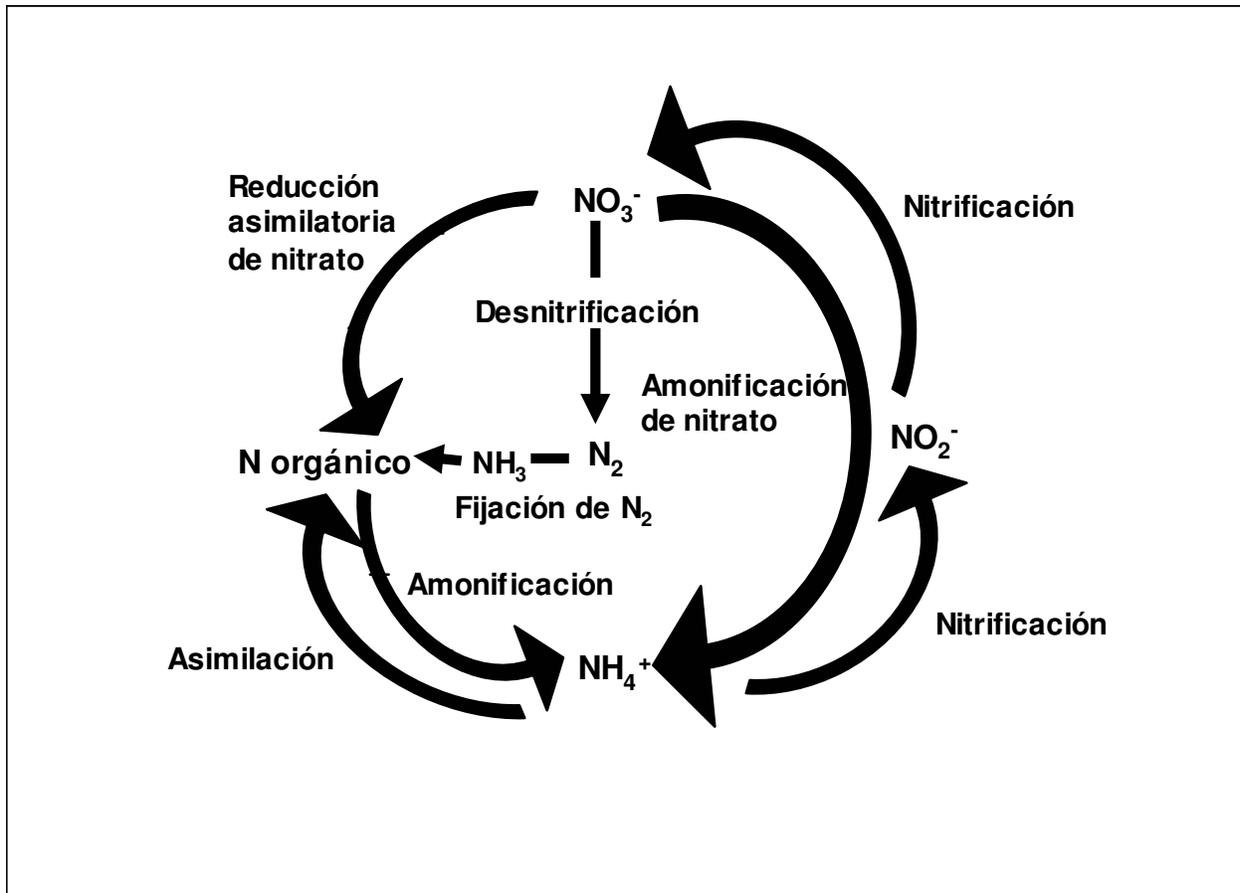


Figura 1.1 Esquema del ciclo del nitrógeno (Prescott, 1999).

La fijación de nitrógeno molecular es realizada por procariontes aerobios y anaerobios y no tiene lugar en los eucariotes (Madigan, 1998). Aunque en menor grado, también puede ocurrir químicamente en la atmósfera a través de descargas eléctricas o puede ser fijado industrialmente por el hombre para la producción de fertilizantes nitrogenados, mediante el denominado proceso de Haber-Bosch (Dickson, 1980).

El amoníaco, producto de la fijación del nitrógeno, es incorporado a la materia orgánica en forma de amina, esto es realizado por plantas principalmente. La descomposición de la materia orgánica conduce a la formación de amonio por el proceso de amonificación.

El amonio a su vez, puede retornar a formas orgánicas o puede ser oxidado por microorganismos aerobios para formar nitrato (nitrificación) que a su vez, puede ser asimilado por los microorganismos o ser reducido mediante dos formas desasimilativas. Una vía ocurre mediante la reducción desasimilativa del nitrato a amonio y la otra, que es realizada por bacterias desnitrificantes, implica la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular, cerrando de esta forma el ciclo (Prescott, 1999). Se puede observar que mediante este ciclo, los microorganismos establecen el equilibrio de los distintos compuestos nitrogenados presentes en el ambiente y a su vez obtienen la energía necesaria para llevar a cabo sus necesidades metabólicas. Sin embargo, la alteración del ciclo puede provocar la acumulación de distintos intermediarios nitrogenados que traen como resultado, efectos nocivos para la salud y el ambiente.

1.2.2 Métodos fisicoquímicos utilizados para la eliminación de amonio y nitrato.

Los principales procesos fisicoquímicos usados para la eliminación de amonio y nitrato del agua son el arrastre con aire, el rompimiento por cloración y el intercambio selectivo de iones (Weston, 1984). Sin embargo, su uso está limitado por los altos costos, y por los problemas de manejo y operación que se llegan a presentar, además, estos protocolos no resuelven el problema real que es la existencia del contaminante ya que sólo trasladan el contaminante de un lugar a otro. A continuación se describen brevemente, cada uno de ellos:

Arrastre con aire:

Mediante este proceso, el amonio es removido por la volatilización del gas amoniacal. El sistema es simple pero tiene algunas desventajas, la eficiencia del proceso de remoción depende de valores altos de pH (10.5 a 11.5) y además resulta costoso por el manejo y operación que implica la inyección de aire (Metcalf, 1991).

Rompimiento por cloración:

Este proceso implica la adición de cloro a las aguas residuales para oxidar el nitrógeno disuelto en forma de amonio hasta nitrógeno molecular. Un problema que

se puede presentar con este proceso es la alta concentración de cloro en las aguas residuales que resulta tóxico para los organismos acuáticos (Weston, 1984).

Intercambio de iones:

Este proceso se basa en la utilización de resinas sintéticas o naturales como la zeolita, las cuales contienen iones unidos a sitios específicos que en presencia de otro ion por el que tengan más afinidad los intercambian. Cuando los sitios de intercambio han sido ocupados por el ion que se pretende capturar, la resina debe regenerarse por la adición de algunos productos químicos, por ejemplo el hidróxido de sodio. El intercambio iónico tiene una aplicación limitada debido principalmente a la vida media de la resina de intercambio y al complejo sistema de regeneración del mismo lo cual lo hace un sistema caro y que requiere de la utilización de grandes cantidades de agua (Metcalf , 1991).

1.2.3 Métodos biológicos de eliminación de amonio y nitrato.

Los sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno de las aguas residuales involucran dos procesos: la nitrificación, donde se lleva a cabo la oxidación de amonio a nitrato efectuada por microorganismos aerobios y la desnitrificación, realizada predominantemente por bacterias anóxicas que catalizan la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular. A continuación se revisan diversos aspectos bioquímicos, microbiológicos y fisiológicos de ambos.

1.2.3.1 Nitrificación.

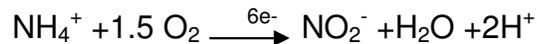
La nitrificación definida como la oxidación biológica del amonio a nitrato es un tanto limitante, puesto que algunos microorganismos heterotróficos pueden producir nitrato a partir de otras formas reducidas de nitrógeno, además del amonio. Por esta razón se ha propuesto que la nitrificación debe ser definida de una forma general como la conversión biológica del nitrógeno en compuestos orgánicos o inorgánicos de una forma reducida a una más oxidada (Alexander, 1977).

Aunque se conoce que algunos heterótrofos pueden producir nitrato y nitrito bajo condiciones apropiadas de cultivo, se sabe también que no contribuyen significativamente al flujo de estos compuestos en la naturaleza. Generalmente se ha

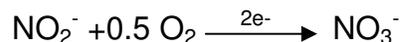
aceptado que los microorganismos autótrofos son, por mucho, los principales responsables de la nitrificación en los ecosistemas naturales.

Mucho de nuestro conocimiento básico sobre la nitrificación fue descubierto por Winogradsky y su grupo en la década de 1890. Su trabajo los llevó al reconocimiento y aislamiento de un grupo de bacterias quimioautótrofas que oxidaban el amonio a nitrito (*Nitrosomonas*) y otro grupo que oxidaba el nitrito a nitrato (*Nitrobacter*). La mayoría de los investigadores coinciden en la creencia de que las especies de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* son las responsables casi enteramente de la nitrificación en suelos.

La oxidación del amonio a nitrito efectuada por *Nitrosomonas*, se puede representar conforme a la siguiente ecuación:



Mientras que las bacterias del género *Nitrobacter*, son capaces de realizar la oxidación subsecuente, de nitrito a nitrato, como se ilustra a continuación:



Existe evidencia de que se producen dos o más intermediarios durante la oxidación del amonio a nitrito, siendo la hidroxilamina el primer intermediario en estas reacciones. Los compuestos postulados como intermediarios en la oxidación de la hidroxilamina a nitrito incluyen al dihidroxiamonio, nitrohidroxilamina, el ion nitrosilo y el óxido nítrico (Klotz, 1997). Debido a la reactividad de los intermediarios involucrados en la oxidación del nitrito a nitrato es difícil que estas reacciones estén mediadas por enzimas (Robertson, 1998).

Las conversiones de amonio a nitrito y de nitrito a nitrato, son reacciones exotérmicas que requieren de oxígeno molecular. El rendimiento energético en la oxidación del amonio a nitrito está cerca de -65 Kcal/mol de amonio y en la oxidación de nitrito a nitrato el rendimiento de energía debe rondar los -18 Kcal/mol de nitrito.

Taxonomía y distribución de las bacterias nitrificantes.

Las bacterias nitrificantes están presentes en suelos, aguas dulces y aguas marinas, incluso han sido aisladas de ambientes extremos, como hielos antárticos, arenas de desierto, en asociación con esponjas marinas y salidas calientes de aguas marinas

(Arrigo, 1995; Diaz, 1997; Sorokin, 1998). Estas bacterias son un objeto de estudio ideal y fascinante, en parte porque la mayoría de ellas tiene un mismo origen filogenético y un metabolismo único. Muchas de las enzimas involucradas en la nitrificación han sido encontradas sólo en este grupo de bacterias (Horz, 2000).

Desde su descubrimiento por Winogradsky en 1897 este grupo bacteriano nunca había recibido tanta atención como en los últimos 10 años. Incluso, solamente unos pocos investigadores son capaces de aislar cultivos puros y mantenerlos indefinidamente (Koops, 1992).

Cómo se mencionó antes la nitrificación es un proceso de dos pasos que involucra dos grupos de bacterias, que por cuestiones prácticas se han denominado bacterias oxidantes de amonio (AOB por sus siglas en inglés) y las bacterias oxidantes de nitrito (NOB por sus siglas en inglés). Hasta ahora, no se ha encontrado bacterias autótrofas capaces de oxidar el amonio a nitrato directamente. Tradicionalmente las AOB fueron clasificadas por su morfología celular en cinco diferentes géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus* (Koops, 1992). Recientemente, estudios basados en secuenciación y análisis del 16S rRNA, han propuesto que los géneros *Nitrospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio* sean agrupados en un solo género llamado *Nitrospira*. Con excepción del género *Nitrosococcus*, todos los otros géneros se encuentran clasificados en la subclase β Proteobacteria (Taske, 1994). El género *Nitrosococcus* no es homogéneo filogenéticamente, mientras que *Nitrosococcus mobilis* pertenece a la subclase β Proteobacteria, *Nitrosococcus oceani* es de la subclase γ Proteobacteria. Hasta ahora, sólo muy pocas especies de la subclase γ Proteobacteria han sido aisladas de habitats marinos, y ninguna de aguas dulces o suelos. En general, las AOB son obligatoriamente quimiolitotótrofos, aunque algunos de ellos pueden utilizar compuestos orgánicos como acetato o piruvato para crecimiento mixotrófico.

Algunas bacterias heterótrofas y ciertos hongos también pueden oxidar el amonio o nitrógeno orgánico reducido a hidroxilamina, nitrito y nitrato, pero mientras que la oxidación de amonio es un proceso del cual obtienen energía las bacterias autótrofas, la nitrificación en organismos heterótrofos no contribuye

significativamente en la obtención de energía. Una característica interesante de estos organismos heterótrofos es su capacidad de poder nitrificar y desnitrificar a la vez (Robertson, 1998). Recientemente se reportó que los autótrofos *Nitrosomonas europaea* y *Nitrosomonas eutropha* que normalmente pueden nitrificar, son capaces de desnitrificar cuando crecen bajo condiciones limitantes de oxígeno (Bock, 1995).

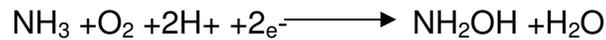
Aspectos fisiológicos de la oxidación de amonio.

Hasta hace poco, la oxidación de amonio se pensaba que era un proceso estrictamente aerobio que requería oxígeno molecular. Usualmente, las AOB pueden funcionar mejor con bajas concentraciones de oxígeno que con bajas concentraciones de amonio. En un quimiostato alimentado con aguas residuales altamente eutróficas, se observó nitrificación incluso a concentraciones de oxígeno menores de 0.05 mg/L. (Abeliovich, 1992).

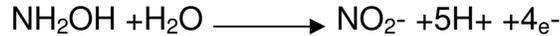
Bajo condiciones anóxicas *N. eutropha* y *N. europaea* pueden oxidar amonio en presencia de piruvato y nitrito como aceptor de electrones. Además, muchos nitrificantes han sido observados en condiciones anóxicas, como las encontradas en sedimentos marinos. En suelos y sedimentos de aguas dulces eutróficas con zonas de concentraciones de oxígeno muy bajas, las AOB's quimiolitautótrofas probablemente se adaptan para nitrificar bajo condiciones microóxicas. Esto puede deberse más a adaptaciones fisiológicas, como por ejemplo, la producción de enzimas con mayor afinidad por el oxígeno, o una alternancia en los aceptores de electrones, que a un cambio en la composición de la comunidad nitrificante (Semrau, 1995).

Enzimas involucradas en la oxidación de amonio.

En los organismos autótrofos oxidantes de amonio, dos enzimas clave son necesarias para la conservación de energía durante el proceso de oxidación, la Amoniaco monoxigenasa (AMO) y la Hidroxilamina oxidoreductasa (HAO). *In vivo* las dos enzimas son codependientes una de la otra; AMO cataliza la oxigenación del amoniaco a hidroxilamina:



Los dos electrones requeridos en este proceso se derivan de la oxidación de la hidroxilamina a nitrito por la HAO



Uno de los átomos de oxígeno en el nitrito deriva del oxígeno molecular, el otro del agua, dos de los cuatro electrones generados por la HAO son transferidos vía el citocromo tetra-heme C₅₄₄ a AMO, o derivados a la cadena transportadora de electrones, donde muchos de los transportadores involucrados y de los intermediarios no han sido completamente caracterizados. Como estas reacciones han sido estudiadas principalmente en *N. europaea*, pueden ser descubiertas alternativas a este patrón si se estudia en una variedad más amplia de organismos de diversos habitats (Moir, 1996).

Amonio monoxigenasa.

Evidencia indirecta sugiere que la enzima AMO en *N. europaea*, y probablemente en otras AOB autótrofas de las subclases β y γ Proteobacteria, tiene tres subunidades, AMO-A, AMO-B y AMO-C, con tamaños, estructuras y arreglos diferentes, localizadas entre la membrana y el espacio periplásmico de las células. La enzima cataliza la oxidación de un amplio rango de sustratos, debido a su función esencial en el metabolismo energético de las AOB, la enzima es probablemente constitutiva.

Sólo se ha podido aislar una AMO funcional la cual fue purificada a partir de la bacteria nitrificante *Paracoccus denitrificans*. Esta enzima consiste de sólo dos subunidades y tiene características en común no sólo con las AMO de otras especies, sino también con la metano monoxigenasa particulada (pMMO) de los metanotrófos. Se ha secuenciado una región de DNA de *Pseudomonas putida*, otra nitrificante autótrofa, la cual mostró una homología parcial con el gen *amoA* de *N. europaea* y existen señales de que AMO también se expresa en este organismo (Daum, 1998)

Las tres subunidades de la AMO de los AOB autótrofos son codificadas por los genes *amoC*, *amoA* y *amoB* del operón *amo*. Los genes *amo* de varias AOB han sido clonados y secuenciados (Rotthauwe, 1997). Se han diseñado oligonucleótidos

dirigidos a *amoA*, basados en secuencias obtenidas de microorganismos presentes en diversos ambientes. El gen *amoA* codifica la subunidad que contiene el sitio activo de la enzima, dentro de él la región que codifica para el COOH terminal parece ser el blanco adecuado para sondas y oligonucleótidos que permiten distinguir entre AOB de las subclases β y γ de las Proteobacteria, así como entre oxidantes de amonio y metano de la subclase γ de las Proteobacteria (Horz, 2000).

Por la función básica de AMO en el metabolismo energético de esta bacteria, los tres genes que codifican para las respectivas subunidades deben estar bajo una fuerte presión funcional, mientras que los espacios intergénicos proveen una región selectiva neutral. Los espacios intergénicos entre los genes *amo* son de tamaño variable en las distintas especies de AOB y pueden utilizarse para distinguir o agrupar cepas. Esta característica puede ser utilizada para determinar la presencia de una cepa o para describir por DGGE la dinámica de una población particular en muestras ambientales (Limburg, 2000).

Homología de AMO y pMMO.

Las enzimas AMO de las bacterias nitrificantes y pMMO de las bacterias metanotróficas son similares y comparten muchas características. La organización de los genes en sus operones es casi idéntica. La alta similitud en la secuencia primaria de los genes sugiere un origen evolutivo común. Las similitudes en la secuencia tanto del DNA como de los aminoácidos entre *amo*/AMO y *pmmo*/pMMO de la subclase γ de las proteobacterias son mayores que las existentes entre los genes *amo*/AMO de las AOB pertenecientes a las subclases γ y β Proteobacteria. Existe evidencia de que las AMO de las AOB pertenecientes a proteobacterias de subclase γ y β y las pMMO de las bacterias metanoxidantes de la subclase γ Proteobacteria tuvieron un origen común y después se separaron en tres líneas diferentes en la evolución temprana del gremio (Holmes, 1995).

Las bacterias metanotróficas pueden oxidar amonio a nitrito por la acción combinada de pMMO y una HAO única, que es diferente de la enzima presente en AOB. Las bacterias metanotróficas y las amonioxidantes ocupan nichos similares en suelos y

ambientes acuáticos, a gradientes contrarios de oxígeno y metano o amonio, respectivamente. Sus interacciones son complejas y pobremente entendidas hasta ahora (Zahn, 1994).

Hidroxilaminareductasa.

HAO es una enzima inusual con una estructura altamente compleja, se localiza anclada en la membrana celular en su dominio hidrofóbico y su dominio hidrofílico se encuentra del lado del espacio periplásmico. Cada unidad de enzima trimérica contiene, como probables componentes del sitio activo siete grupos heme del tipo c y un residuo heme inusual P₄₆₀. Las HAO solubles de las bacterias heterótrofas nitrificantes *P. denitrificans* y *Pseudomonas* PB16, no contienen grupos heme, lo que las hace muy diferentes de las HAO de las AOB autótrofas y pueden ser responsables de la incapacidad de estos heterótrofos para crecer autotróficamente por nitrificación (Moir, 1996).

Genética de AMO.

Muchos de los genes involucrados en la oxidación de amonio presentan múltiples copias por genoma. Se ha sugerido que el número de copias de diferentes genes pueden ser responsables de mantener un cierto número de productos de estos genes. Se han observado entre dos y cuatro copias del gen *amo* en las AOB de la subclase β de las proteobacterias y a veces existen copias adicionales de *amoC* afuera del operón que codifica para la enzima, sin embargo *N. oceani* (ATCC 19707) que pertenece a las γ Proteobacteria, y otra cepa sin nombre (C113) sólo tienen una copia del operón (Alzerreca, 1999). Todas las copias múltiples descritas hasta ahora son muy similares, y no está claro si presentan funciones diferentes. Estudios con mutantes por inserción de *N. europaea* que tiene dos genes ligeramente diferentes, en la que sólo una de cada copia de *amoA* fue inactivada, mostró que ambas copias son expresadas. La inactivación de sólo una copia resultó en un crecimiento más lento, menos RNAm de tamaño completo y actividad reducida de AMO. Como la mayoría de las copias de los genes son casi idénticas y existe mucho menos similitud entre los genes *amo* de diferentes especies, es poco probable que éstas se originaron de una transferencia horizontal de genes, probablemente estos surgieron

de un evento de duplicación genética que sucedió relativamente temprano en la evolución de este linaje. Es de particular interés para la ecología evolutiva que la más alta multiplicidad de genes *amo* se encuentra en organismos del grupo *Nitrospira/Nitrosolobus*, mientras que las dos AOB investigadas hasta ahora, de la subclase γ sólo tienen una copia (Rotthauwe, 1997).

Regulación de la función enzimática.

El amonio regula la actividad de AMO a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional. Productos de los tres genes *amo* fueron detectados en el mismo transcrito mediante RT-PCR, indicando que *amoC* es parte del operón *amo*. En *N. europaea*, la transcripción de los genes *amo* así como los de HAO fue inducida por amonio y bajó la producción de RNAm de estos genes después de 8 horas en que las células estuvieron en condiciones de falta de amonio.

Sin embargo, al parecer, se mantienen cantidades basales altas de estas enzimas en las células ya que son claves para el metabolismo. En *N. europaea*, la HAO de células que no han sido suplementadas con amonio permaneció estable por más de 72 horas, como lo mostró un estudio por Western blot y mediciones de la actividad enzimática (Stein, 1998).

La limitación de amonio causó inhibición específica de la actividad enzimática de AMO pero no de HAO en 24 h, mientras se observó un ligero cambio en la oxidación de amonio en un medio sin amonio. Bajo condiciones de falta de amonio por largos periodos (342 días), *N. europaea* mantiene una actividad enzimática estable de AMO y HAO, y las células conservan un nivel alto de estas enzimas. Después de la adición de amonio o hidroxilamina, hubo una respuesta inmediata, medida como producción de nitrito, sin síntesis de nuevas enzimas, si no más bien debido al incremento de la actividad específica de las enzimas ya sintetizadas (Wilhelm, 1998).

1.2.3.2 Desnitrificación

La desnitrificación constituye una de las importantes secciones del ciclo del nitrógeno a nivel mundial, que es llevado a cabo por bacterias. El ciclo manifiesta la química de óxido reducción inherente a los principales compuestos inorgánicos involucrados como lo son el nitrógeno molecular, el amonio y el nitrato.

El nitrógeno es introducido en la biosfera por fijación ya sea biológica o química del nitrógeno molecular (N_2) y es removido por la desnitrificación que cataliza sucesivamente la formación de enlace N-N a partir de los intermediarios óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O). El proceso es casi exclusivamente facultativo, su expresión es disparada en la célula por los parámetros ambientales como la baja presencia de oxígeno y la disponibilidad de un óxido de nitrógeno.

La desnitrificación es parte del aparato bioenergético de la célula bacteriana, dónde los oxianiones de N como el nitrato y nitrito y los óxidos gaseosos de N como el NO y N_2O son utilizados en lugar del oxígeno (O_2) como aceptores del transporte de electrones de la fosforilación.

Entre los procariontes la distribución taxonómica de la capacidad de desnitrificar no sigue ningún patrón conocido. La reacción es llevada a cabo por gran variedad de bacterias que pertenecen a varias subclases de las proteobacterias. La desnitrificación se extiende también a las arqueas, donde se ha encontrado en halófilos e hipertermófilos, lo cual probablemente tiene un significado evolutivo. También el reciente descubrimiento de un grupo de enzimas de desnitrificación en las mitocondrias de algunos hongos es intrigante y genera nuevas preguntas (Kobayashi, 1996).

La nitrito reductasa es la enzima clave de la desnitrificación ya que cataliza la reacción que involucra a un intermediario gaseoso. Para que el proceso de desnitrificación llegue a la formación de nitrógeno molecular, la reacción de la nitrito reductasa es complementada por la actividad de dos metaloenzimas distintas, las cuales utilizan NO y N_2O como sustratos. El proceso abarca importantes problemas biológicos de la estructura y la función de la bioenergética microbiana y requiere ser abordado interdisciplinariamente para su estudio (Ferguson, 1998).

Desarrollo histórico.

Margulis y Lovelock (Margulis, 1974) postularon que las bacterias generaron casi todo el nitrógeno de la atmósfera terrestre y que ahora mantienen dicho nivel por desnitrificación continua. Regresando en el tiempo geológico, el volumen de nitrógeno constantemente removido del suelo y el agua por desnitrificación debe de

ser enorme. La acción es ahora reconocida, pero nadie conocía, o aún sospechaba su existencia hasta finales del siglo diecinueve.

Este desconocimiento puede ser comprendido si consideramos que un proceso tan antiguo como la desnitrificación tuvo que esperar el desarrollo de la química y la microbiología.

La identificación de los elementos nitrógeno y oxígeno, y la demostración de su existencia como componentes principales del aire sucedieron en las últimas tres décadas del siglo dieciocho. De esta manera, fue hasta mediados del siglo diecinueve que se contó con los métodos analíticos para poder revelar la desnitrificación, pero la microbiología en esa época era una ciencia en ciernes.

Para la segunda mitad del siglo diecinueve los métodos de aislamiento, cultivo y descripción de microorganismos, así como el desarrollo de análisis de su actividad química ayudaron a establecer las capacidades de desnitrificación de algunas bacterias (Smith, 1897).

El nitrato, era bien reconocido como un fertilizante para las plantas, y por lo tanto un proceso que resultaba en su pérdida llamó la atención de los científicos del suelo.

Mesuel (Mesuel, 1875) sugirió que las bacterias eran las responsables de la destrucción del nitrato y conjeturó que servía como oxidante que ayudaba en la degradación de la celulosa.

En 1882 Gayon y Dupetit (Gayon, 1882) introdujeron el término desnitrificación para describir la producción de gas por bacterias por la degradación de nitrato en condiciones anaerobias, a partir de observaciones realizadas en laboratorio en donde bacterias crecidas en lodos sólo asimilaban una cantidad muy baja del nitrógeno suministrado en el sistema experimental para la formación de biomasa. También fueron estos investigadores quienes por primera vez abandonaron los medios de cultivo complejos derivados de plantas o animales al cambiarlos por compuestos de carbono más simples que funcionaran como donadores de electrones para la desnitrificación.

En 1886 (Gayon, 1886) aisló a partir de lodo dos cultivos puros de cepas desnitrificantes. Los aislados fueron llamados *Bacterium denitrificans* alfa y beta.

Estos investigadores notaron que la desnitrificación no es una fermentación sino más bien un tipo de respiración del nitrato utilizando material orgánico como el citrato o asparagina como donadores de electrones.

Diversos grupos determinaron y publicaron las diferencias fisiológicas que observaron entre algunos de los desnitrificantes mejor conocidos como; *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas stutzeri* (Aminuddin, 1974).

Con el desarrollo de las técnicas moleculares y su aplicación en microbiología se ha podido estudiar más precisamente la fisiología, ecología y taxonomía de los organismos desnitrificantes, lo cual ha llevado a una mayor comprensión de este fenómeno y un mejor manejo para su aplicación en procesos de biorremediación (Michalski, 1985; Abmus, 1997; Braker, 1998; Kloos, 1998).

Diversidad de las bacterias desnitrificantes.

Las bacterias con capacidad desnitrificante pertenecen a una amplia variedad de grupos taxonómicos. Los desnitrificantes son más comunes dentro de las clases α y β Proteobacteria, aunque no existe ningún patrón de distribución distinguible. Es notable la ausencia de la desnitrificación entre las enterobacterias las cuales reducen el nitrato a nitrito al cual posteriormente reducen a amonio (Einsle, 2004).

La hipertermofilia (Huber 1992; Völkl 1993) y la alcalofilia (Berendes and Tindall 1996) son características recientemente identificadas entre algunos otros desnitrificantes.

Diversidad metabólica de especies desnitrificantes

Arqueas	Bacterias (Gram-negativas)
Organotróficas	Diazotróficas
Halófilicas	<i>Aquaspirillum</i>
<i>Halurcula</i>	<i>Azospirillum</i>
<i>Halobacterium</i>	<i>Azoacoccus</i>
<i>Haloferax</i>	<i>Bacillus</i>
Hipertermófilicas	<i>Bradyrhizobium</i>
<i>Pyrobaculum</i>	<i>Pseudomonas</i>
Bacterias (Gram-positivas)	<i>Rhodobacter</i>
Organotróficas	<i>Rhodopseudomonas</i>
Formadoras de esporas	<i>Sinorhizobium</i>
<i>Bacillus</i>	Termófilicas
No formadoras de esporas	<i>Aquifex</i>
<i>Jonesia</i>	<i>Bacillus</i>
Bacterias (Gram-negativas)	<i>Thermothrix</i>
Fototróficas	Psicrofílicas
<i>Rhodobacter</i>	<i>Aquaspirillum</i>
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Halomonas</i>
<i>Rhodoplanes</i>	Formadoras de pigmentos
Litotróficas	<i>Chromobacterium</i>
Oxidantes de azufre	<i>Flavobacterium</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Thiobacillus</i>	Magnetotácticas
<i>Thioploca</i>	<i>Magnetospirillum</i>
Oxidantes de Hidrógeno	Patógenas
<i>Ralstonia</i>	<i>Achromobacter</i>
<i>Paracoccus</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Agrobacterium</i>
Oxidantes de nitrito o amonio	<i>Compylobacter</i>
<i>Nitrobacter</i>	<i>Eikenella</i>
<i>Nitrosomonas</i>	<i>Flavobacterium</i>
Organotróficas	<i>Kingella</i>
Carboxidotróficas	<i>Moraxella</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Morococcus</i>
<i>Zavarzinia</i>	<i>Neisseria</i>
Oligocarbofilicas	<i>Ochrobactrum</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Oligella</i>
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Pseudomonas</i>
Fermentadoras	<i>Sphingobacterium</i>
<i>Empedobacter</i>	<i>Tsukamurella</i>
<i>Azospirillum</i>	
Anaerobias facultativas	
<i>Alteromonas</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
Aerobias	
<i>Paracoccus</i>	
<i>Alcaligenes</i>	

Tabla 1.2 Diversidad metabólica y taxonómica de géneros bacterianos con especies desnitrificantes

La Tabla 1.2 enlista los géneros de especies desnitrificantes agrupadas de acuerdo a su modo principal de crecimiento o ya sea por algunas características fisiológicas dominantes.

La mayoría de los desnitrificantes son organismos aerobios heterótrofos que transfieren equivalentes redox de la oxidación de una fuente de carbono a un óxido de nitrógeno bajo condiciones anaerobias. Los desnitrificantes autotróficos utilizan compuestos inorgánicos de azufre, hidrógeno, amonio o nitrato. Recientemente se ha encontrado que la oxidación de Fe (II) está también acoplada a un proceso de desnitrificación completo (Straub, 1996). La reacción es llevada a cabo por desnitrificantes bien conocidos así como por bacterias Gram negativas.

Entre las bacterias carbonotrofas, sólo *Pseudomonas carboxydohydrogena* crece autotróficamente bajo condiciones desnitrificantes con hidrógeno molecular como donador de electrones y dióxido de carbono como fuente de carbono (Frunzke, 1990).

La oxidación de CO no está acoplada al crecimiento desnitrificante en ninguna bacteria conocida. La desnitrificación y la amonificación han sido descritas para *Pseudomonas putrefaciens* (Samuelsson, 1985).

El proceso de desnitrificación.

La desnitrificación consiste en una serie de reacciones secuenciales en donde primeramente el nitrato es reducido a nitrito seguido por la reducción del nitrito a óxido nítrico, el cual es transformado a óxido nitroso y finalmente éste es reducido a nitrógeno elemental en estado gaseoso que es liberado a la atmósfera. Cada una de estas etapas son catalizadas por distintas enzimas (Knowles, 1982), conforme a lo que se observa en la Figura 1.3.

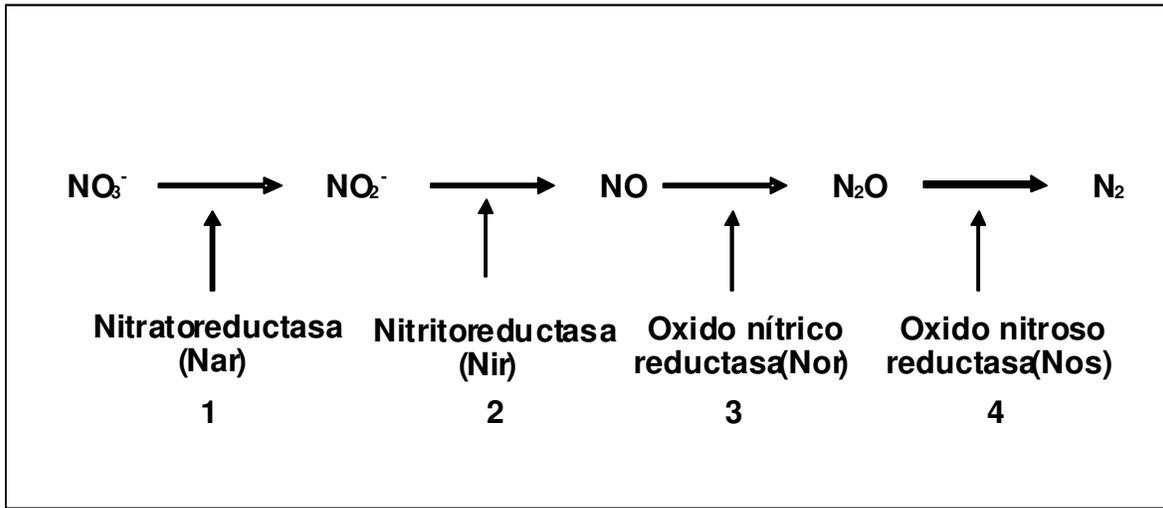


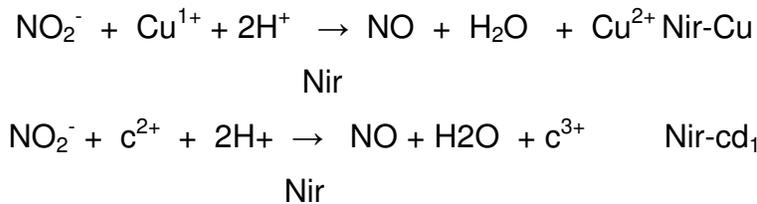
Figura 1.3. Etapas y enzimas involucradas en la la desnitrificación y enzimas involucradas en cada una de éstas.

El primer paso de desnitrificación es la reducción de nitrato a nitrito por la enzima nitrato reductasa (Nar). La reacción se representaría de la siguiente manera donde UQH_2 y UQ son las formas reducida y oxidada respectivamente de la ubiquinona (Jetten, 1997).



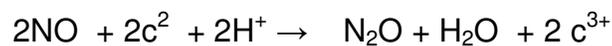
En *Pseudomonas denitrificans* se han observado dos diferentes enzimas de nitrato reductasa. Una de ellas está unida a la membrana y utiliza a la ubiquinona como sustrato (donador de electrones) y el molibdeno es un cofactor necesario para que realice la reacción, esta enzima está constituida por tres subunidades con peso molecular de 120, 60 y 20 kDa. La otra enzima identificada, se encuentra en el periplasma y se desconoce su donador de electrones, consta de dos subunidades de peso molecular de 94 y 19 kDa respectivamente (Bell, 1990). La enzima unida a membrana sólo es expresada bajo condiciones anóxicas, mientras que la enzima periplásmica puede ser sintetizada y activada en presencia de oxígeno (Siddiqui 1993).

La reducción de nitrito a óxido nítrico, se lleva a cabo por la enzima nitrito reductasa (Nir). La ecuación de la reacción es la siguiente:



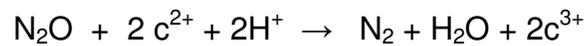
Se conocen dos tipos de estas enzimas, una contiene cobre (Nir-Cu) y la otra contiene un citocromo hemo (Nir-cd₁). La primera está constituida por un homotrímero, con subunidades de 36 kDa de peso molecular, y dos átomos de cobre por monómero. La otra contiene un citocromo cd₁, que consiste de un homodímero de 64 kDa por subunidad, donde cada monómero contiene un hemo c y un hemo d₁. Las dos enzimas son funcional y fisiológicamente similares (Glockner 1993).

La tercera etapa, es catalizada por la enzima óxido nítrico reductasa (Nor) y consiste en la reducción del óxido nítrico al óxido nitroso, la reacción se lleva a cabo como se presenta a continuación:



En *Paracoccus denitrificans*, se ha observado que la Nor es una enzima unida a membrana, que consta de dos subunidades. Una subunidad (16 kDa), contiene un hemo c y la otra de 53 kDa, contiene un hemo b. Dentro del proceso de desnitrificación esta etapa es relativamente rápida, en estudios con *Thiosphaera pantotropha*, se observó que esta reacción fue diez veces más rápida que la reducción del óxido nitroso (Kroneck, 1992), esto debido probablemente a la presión selectiva que puede existir debida a la alta toxicidad del óxido nítrico para las bacterias, hongos, virus e incluso para las propias bacterias desnitrificantes (Braun, 1991).

La última etapa del proceso respiratorio desnitrificante consiste en la reducción del óxido nitroso a nitrógeno molecular, catalizada por la óxido nitroso reductasa (Nos). Ésta se esquematiza en la siguiente ecuación.



Se ha encontrado que esta etapa puede ser considerada como un proceso respiratorio por sí mismo, ya que muchas bacterias desnitrificantes son capaces de usar el óxido nitroso como único aceptor de electrones durante la oxidación de la materia orgánica (Zumft, 1997).

Se ha podido purificar Nos de diferentes microorganismos, se sabe que se encuentra en el periplasma, pero no ha sido posible cristalizarla, esto debido principalmente a que esta enzima es lábil al oxígeno (Ferguson, 1998).

La enzima purificada es un homodímero de aproximadamente 70 KDa, cada subunidad contiene 4 átomos de cobre, los cuales están organizados en dos diferentes centros dinucleares conocidos como CuA y CuZ. El centro CuA, es el sitio de entrada de electrones, mientras que el centro CuZ, se piensa que es el sitio de reducción del óxido nitroso, aunque no hay evidencia directa que así lo demuestre (Jetten, 1997).

Condiciones y factores involucrados en el proceso de desnitrificación.

Como se ha mencionado el proceso de desnitrificación es complejo e involucra varias etapas mediadas por enzimas y cada etapa es fuertemente regulada por la presencia de oxígeno y la cantidad de sustrato en el medio.

Existen otros factores como el pH, la relación C/N, la fuente de energía y la temperatura que influyen en la desnitrificación, aunque no todos los desnitrificantes responden a todos estos factores, algunas especies sí son sensibles a todos ellos.

La expresión de las enzimas desnitrificantes está fuertemente influenciada por el compuesto nitrogenado que tenga por sustrato la bacteria y la concentración de éste. La expresión de la nitrito reductasa en *Pseudomonas aeruginosa* está en función de la concentración de nitrato (Zennaro, 1993). En el mismo trabajo se reporta que hubo niveles bajos de expresión de la enzima nitrito reductasa en ausencia de nitrato, ya fuera en condiciones aerobias o anaerobias. Sin embargo, se presentaron niveles altos de producción de esta enzima en presencia de nitrato, aún bajo condiciones aerobias.

La mayoría de las enzimas involucradas en la desnitrificación son inhibidas por el oxígeno, aunque este efecto en la mayoría de los casos es reversible. Al parecer el mecanismo por el cual el oxígeno inhibe estas enzimas es debido a una competencia entre la enzima y el oxígeno por captar electrones más que por una inactivación de la enzima, por lo cual una vez que no hay presencia de oxígeno la enzima sigue siendo completamente funcional. Cabe mencionar que las enzimas que se encuentran al final de la cadena respiratoria desnitrificante son más sensibles a la presencia de oxígeno que las que se encuentran al principio. Diversos estudios mostraron que a bajas concentraciones de oxígeno, se observa una notable fracción molar de óxido nitroso (Knowles, 1982). Aunque estos resultados contrastan con otros estudios realizados en *Flexibacter canadensis*, donde se observó que la enzima nitrito reductasa es más sensible al oxígeno que otras enzimas, como la óxido nítrico y la óxido nitroso reductasa (Knowles, 1994).

Un factor de suma importancia que puede convertir la desnitrificación en un proceso de desasimilación es la relación Carbono/Nitrógeno (C/N). Se ha observado que esta variable está relacionada con la acumulación de los compuestos involucrados en la desnitrificación, e incluso puede encausar hacia la desasimilación reductiva de nitrato a amonio. En términos generales, el establecimiento experimental del valor de la C/N, radica en su valor estequiométrico. Considerando lo anterior se pueden distinguir tres zonas: 1) C/N menor a la estequiométrica, que genera una desnitrificación incompleta; 2) C/N estequiométrica donde la desnitrificación es completa y 3) C/N mayor a la estequiométrica que implica una desnitrificación completa y materia orgánica residual (Cuervo, 1999).

El pH ha mostrado ser otro parámetro importante en el proceso de desnitrificación, se ha observado que esta variable afecta la velocidad de reacción de las enzimas desnitrificantes. Existen estudios con *Paracoccus denitrificans* que señalan diferencias muy marcadas entre valores de pH ácidos y básicos (Thomsen, 1994). En dicho trabajo se observó que a un pH de 5.5, la velocidad de reacción de las enzimas desnitrificantes disminuye, observándose una acumulación transitoria de intermediarios como el nitrito y el óxido nitroso. Sin embargo, a un pH de 8.5, la

presencia de tales intermediarios no fue pronunciada, encontrándose nitrógeno molecular inmediatamente después que el nitrato empezó a consumirse. Por su parte Pérez (Perez, 1998), trabajando con reactores desnitrificantes en régimen continuo (alimentados con acetato, lactato y etanol), encontró que a valores de pH entre 6 y 9 se lograron rendimientos desnitrificantes de 0.95, sin observar intermediarios nitrogenados. Sin embargo, a pH de 5 la desnitrificación se inhibió.

La fuente de electrones también parece influir en la acumulación de algunos intermediarios nitrogenados como el nitrito, debido a cierta competencia por la fuente de energía que parece existir entre las enzimas nitrato y nitrito reductasas. Estudios realizados por Van Rijn (1996) con *Pseudomonas stutzeri*, mostraron mayor acumulación de nitrito cuando se empleó acetato como fuente de energía, que cuando se usó butirato. Ellos también observaron que el butirato fue consumido más lentamente que el acetato, por lo que arguyen que en presencia de nitrato y nitrito, los electrones del acetato fluyen preferentemente hacia la nitrato reductasa, mientras que los electrones generados por el butirato reducen más rápidamente la nitrito reductasa que la nitrato reductasa.

Respecto a la temperatura, se han observado velocidades de desnitrificación muy bajas y constantes a 5° C, mientras que a 20° C las velocidades son constantes y mayores. Las temperaturas recomendables para mantener velocidades desnitrificantes adecuadas, oscilan entre 20 y 35° C (Cuervo, 1999).

2. MONITOREO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS.

2.1 Técnicas clásicas para el estudio de comunidades microbianas en plantas de tratamiento de aguas.

Smith (1943) publicó uno de los primeros reportes en el cual se relacionan problemas debidos a la estructura de los lodos de una planta de tratamiento de agua, con la presencia de un alto número de bacterias filamentosas. En ese trabajo se utilizó la microscopia de luz como una herramienta para visualizar la causa de un problema particular. Desde entonces el principio no ha cambiado, aunque si se ha refinado considerablemente. Esto ha permitido estudios comparativos basados en la

presencia o ausencia de filamentos específicos con respecto a la composición del lodo o la operación de la planta. Sin embargo, hay que recordar que la morfología de todas las bacterias (incluyendo a las filamentosas) es una característica bastante inestable y no es un buen principio para la identificación, además de que una gran cantidad de géneros comparten las mismas características morfológicas.

Cabe hacer notar que los métodos basados en la simple microscopia óptica no permiten el monitoreo de los grupos bacterianos que son responsables de los procesos de nitrificación y desnitrificación, puesto que estas bacterias presentan pocos tipos morfológicos, sin embargo, en estos días es todavía una técnica de monitoreo estándar en muchas plantas (Baumann, 1996).

Otra técnica clásica está basada en el aislamiento de cultivos puros de bacterias, seguida por la identificación y si es necesario, la caracterización fisiológica de los aislados. Se ha determinado que aún con el uso de un medio "no selectivo", no se puede obtener un panorama razonablemente completo de la estructura de la comunidad (Prakasam, 1967). Los lodos activados contienen una diversidad tremenda de bacterias que van desde las que crecen extremadamente lento (por ej. las nitrificantes quimiolitautótrofas), hasta aquellas que tienen un tiempo de generación menor a los 30 min. (por ej. *Aeromonas* spp.) también se encuentran en estas comunidades desde aerobios estrictos así como anaerobios facultativos y anaerobios estrictos. Estos mismos estudios aún en medios optimizados, siempre muestran menos del 20%, y generalmente sólo entre el 1% y 10% de las bacterias visualizadas por métodos microscópicos (Pike, 1971; Wagner, 1993). Esto se debe en parte al uso del medio inadecuado y las condiciones de cultivo y en parte al empaquetamiento de las células en los flóculos de los lodos activados. Todavía en nuestros días no existen técnicas adecuadas para poder obtener suspensiones de células a partir de los flóculos de los lodos activados y poder pasar esta suspensión a cajas Petri para su crecimiento. De ahí que se considere que los métodos basados en cultivo no son adecuados para la cuantificación exacta de poblaciones bacterianas involucradas en el tratamiento de aguas residuales (Wagner, 1993).

Los científicos interesados en la cuantificación todavía utilizan métodos directos independientes de cultivo como la inmunofluorescencia. Estos métodos directos tienen el potencial de evitar uno de los problemas principales en el análisis cuantitativo de poblaciones de lodos activados. Este problema es la identificación definitiva de un número estadísticamente significativo de colonias, lo cual es muy laborioso. Los estudios antiguos por cultivo han mostrado que aún cuando los científicos aislaban la bacteria correcta e importante para una planta dada, comúnmente tenían problemas con la clasificación. Esto fue en la época de la clasificación artificial no basada en relaciones filogenéticas (Wagner, 1993).

2.2 Técnicas quimiotaxonómicas de monitoreo.

En la década de los ochentas se realizaron muchos intentos para analizar por métodos quimiotaxonómicos directos, las estructuras de las comunidades bacterianas de lodos activados utilizando perfiles de quinonas respiratorias, patrones de poliaminas y patrones de fosfolípidos (Hairaishi,. 1989; Auling, 1991; Findlay, 1996). Sin embargo, la utilización de estos componentes celulares cuya presencia o concentración están influenciadas por el ambiente, o etapa del ciclo de vida, representa una desventaja para el monitoreo directo de comunidades. Además de que, relacionar la concentración de tales compuestos con el número de células, resulta poco confiable. Aunque cabe mencionar que este tipo de monitoreo es rápido, barato y aplicable a un gran número de muestras y puede ser una buena herramienta para rastrear poblaciones microbianas en ambientes que son bien comprendidos en términos de la diversidad total presente en el mismo (Auling,. 1991).

2.3 Identificación de bacterias por inmunofluorescencia

Los principales intentos para la identificación *in situ* de células microbianas específicas en plantas de tratamiento de aguas residuales han estado basados en inmunofluorescencia, esta técnica ha sido exitosamente utilizada en varias plantas de tratamiento de aguas, incluso en estudios de bacterias oxidantes de amonio (Volsch, 1990). La detección de este grupo de bacterias de crecimiento lento en medios de cultivo estándar requiere de tiempos de incubación de por lo menos un mes. La detección y enumeración de dos serotipos de *Nitrosomonas* spp. por marcaje

inmunofluorescente seguido por análisis de citometría de flujo requiere unas cuantas horas, sin embargo, aunque esta técnica puede ser aplicada directamente a la muestra compleja, todavía se requiere del aislamiento previo del organismo de interés para producir los anticuerpos. Otros problemas son la difusión limitada de los anticuerpos y potencial de variación antigénica de los grupos de interés.

2.4 Técnicas de monitoreo basadas en ácidos nucleicos.

Estas técnicas toman como marcadores moleculares los ácidos nucleicos presentes en todas las células. Las moléculas de DNA y RNA permiten establecer relaciones filogenéticas por técnicas muy poderosas y confiables. Son muchas las técnicas basadas en ácidos nucleicos, debido a la versatilidad que presentan estas moléculas y la cantidad de información que puede obtenerse de ellos, en la actualidad la mayoría de las técnicas utilizadas están basadas la PCR, ya que esta técnica permite obtener grandes cantidades de regiones específicas de una molécula de ácido nucleico. Las técnicas de clonación, secuenciación, TGGE y DGGE han sido las más ampliamente utilizadas para el monitoreo de comunidades bacterianas (Ramírez-Saad, 1998; Ramírez-Saad,. 1999; Goregues, 2005).

El esquema general de la estrategias para el estudio de comunidades bacterianas basadas en ácidos nucleicos se resume en la Figura 1.4.

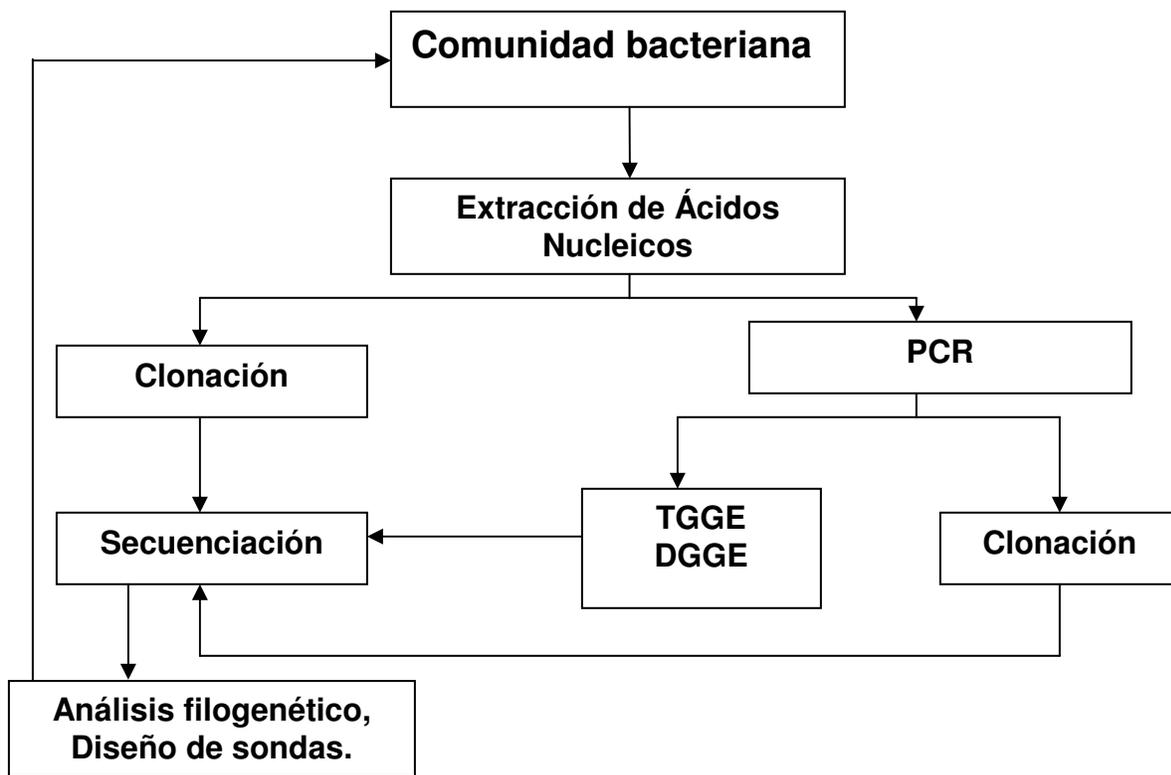


Figura 1.4. Estrategias para el monitoreo de comunidades bacterianas por técnicas basadas en ácidos nucleicos.

La utilización del rRNA como marcador molecular para analizar la estructura de las comunidades microbianas, de una forma independiente de cultivo, ha producido resultados interesantes. Al respecto, existen varios tipos de estudios basados en rRNA; la utilización de sondas de oligonucleótidos más o menos específicas, en combinación con la hibridación *in situ* y la recuperación directa de fragmentos de rRNA seguida de clonación y secuenciación o por medio de RT-PCR seguido por DGGE y TGGE.

La técnica de FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) consiste en la utilización de sondas de DNA unidas a un marcador fluorescente las cuales, bajo las condiciones adecuadas, hibridizan con el mRNA para el cual fueron diseñadas, son observadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia. Esta técnica permite distinguir a las poblaciones que sean metabólicamente activas en la comunidad, ya que las sondas generalmente están diseñadas para hibridar con mRNA de genes

relacionados con funciones metabólicas específicas que distinguen a unas poblaciones de otras (Manz, 1994).

El aislamiento de rRNA (generalmente del fragmento 16S), su clonación y su posterior secuenciación nos dan una visión más general de la comunidad ya que permite por medio de la utilización de bancos de datos, la identificación de las poblaciones que están presentes aunque también incluyen aquellas que no realizan el proceso de interés. Entre las desventajas de esta técnica están su laboriosidad y su alto costo (Amman, 1995).

La técnica de RT-PCR esta basada en el aislamiento del mRNA, utilizándolo como molde para sintetizar el DNA correspondiente, y posteriormente amplificarlo, la técnica puede ser cuantitativa si se utiliza una variación de la técnica conocida como PCR en tiempo real.

Se han utilizado sondas de oligonucleótidos dirigidos al rRNA y sus genes respectivos, específicas de grupo y género para analizar por hibridación *in situ* la estructura de la comunidad bacteriana de lodos activados (Wagner, 1993). Generalmente más del 75% de las bacterias teñidas con DAPI (un colorante de DNA) también hibrida con la sonda bacteriana. Esto también prueba un alto contenido de rRNA celular, lo cual sugiere fuertemente la actividad de la mayoría de las células presentes en los lodos (Wagner, 1993).

Otros científicos han utilizado la secuenciación del rRNA y el subsecuente análisis comparativo de los datos de las bibliotecas de clonación del 16S rDNA para analizar la diversidad microbiana presente en los lodos activados (Bond, 1995). Sin embargo esta técnica presenta la desventaja de no ser cuantitativa; por lo que se sugiere generalmente la combinación de las dos diferentes técnicas basadas en rRNA, análisis de la secuencia del rRNA seguida por la hibridación con sondas basadas en las secuencias obtenidas. Sin embargo esto es laborioso y lleva mucho tiempo caracterizar con una resolución alta la estructura de la comunidad de los lodos activados.

La técnica de hibridación Dot blot para la cuantificación de secuencias pequeñas de rRNA es otra técnica molecular que se ha aplicado para el monitoreo de poblaciones metanogénicas involucradas en el tratamiento anaerobio de aguas residuales (Raskin,. 1994). En esta técnica oligonucléotidos marcados radiactivamente y dirigidos hacia regiones específicas del rRNA son aplicados para cuantificar la abundancia relativa de un rRNA particular comparado con el rRNA total cuantificado con una sonda universal. Dentro de las ventajas que presenta esta técnica es que permite un examen rápido de múltiples muestras en un periodo corto de tiempo, sin embargo el contenido de rRNA celular es poco estable y por lo tanto es difícil extrapolar de las fracciones relativas al número absoluto de células.

2.5 Monitoreo de la diversidad microbiana por análisis de DGGE (Electroforésis en gel con gradiente de desnaturalización) del 16S rDNA.

El análisis por DGGE de fragmentos de 16S rDNA ha sido usado para estudiar la diversidad genética de las comunidades microbianas en diferentes ambientes, incluyendo biorreactores experimentales y sedimentos de lodos.

En el DGGE, fragmentos de DNA amplificados por PCR pueden ser separados con base a su secuencia. La separación en DGGE esta basada en la movilidad electroforética de DNA de doble cadena parcialmente desnaturalizado en geles de poliacrilamida, la cual decrece comparada con la movilidad de la forma completamente helicoidal de la molécula. La desnaturalización de los fragmentos se da por medio de dominios de fusión: pequeñas secuencias de bases con un mismo punto de desnaturalización.

Una vez que el dominio de fusión con el punto más bajo de desnaturalización migra a un nivel en el gel donde la concentración de desnaturalizantes alcanza este punto, se da una transición de una molécula helicoidal a una parcialmente desnaturalizada, y la migración de la molécula prácticamente se detiene. La variación de la secuencia dentro de estos dominios causa que su punto de desnaturalización sea diferente. Por lo tanto variaciones en la secuencia de fragmentos particulares detienen la migración en diferentes posiciones del gradiente desnaturalizante y así pueden ser separados efectivamente por DGGE (Muyzer,. 1993).

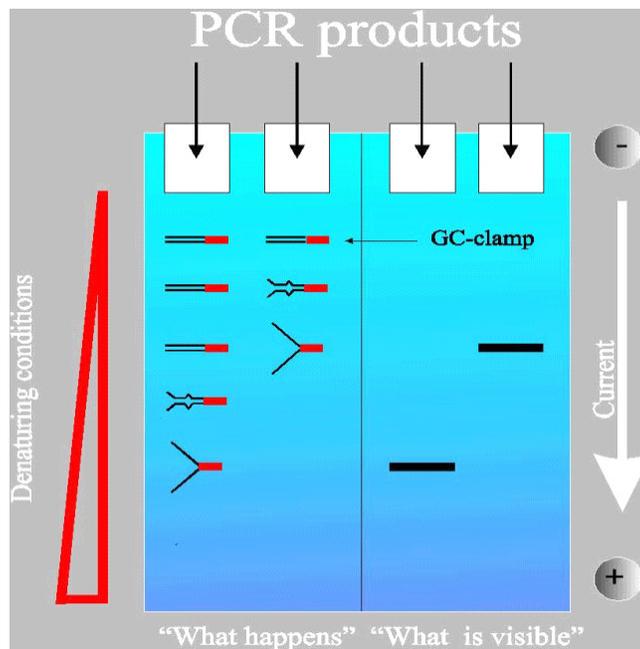


Figura 1.5. Esquema del principio en el cual se basan el DGGE y TGGE. En el caso del DGGE se utiliza una temperatura fija ($\approx 60^{\circ}\text{C}$) y se utiliza un gradiente de compuestos desnaturizantes del DNA. En el TGGE, la concentración de desnaturizantes es fija y se utiliza un gradiente de temperatura a lo largo del gel.

El análisis por DGGE de fragmentos de 16S rDNA amplificado por PCR de diferentes comunidades microbianas demuestran la presencia de varias bandas distinguibles en el patrón de separación, que probablemente se derivan de las especies predominantes dentro de esas comunidades (Logemann, 1998).

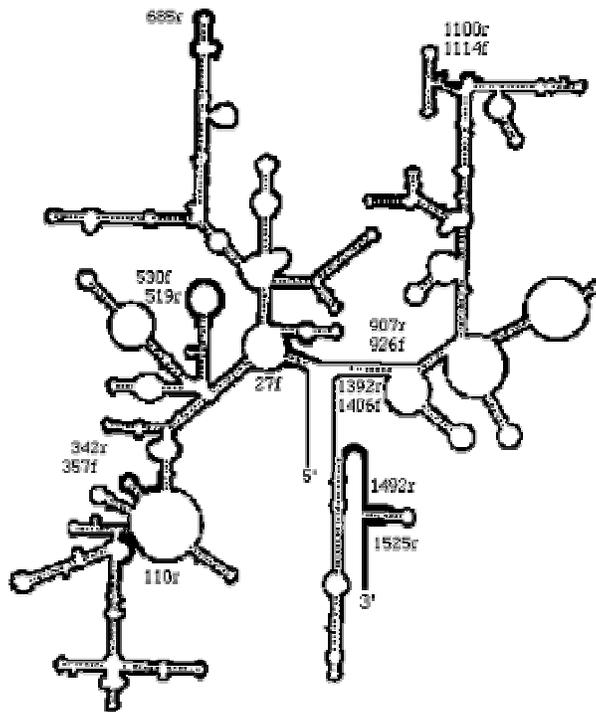


Figura 1.6. Configuración de la molécula 16S rRNA. En esta figura se muestra la configuración que toma la molécula del 16S rRNA formado anillos dentro de ella misma por complementaridad de sus bases, en color más oscuro se remarcan las regiones conservadas y en color claro las regiones variables y altamente variables.

3. TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS POR ANÁLISIS DEL ESPACIO INTERGÉNICO TRANSCRITO (ITS)

En las bacterias, muchos genes con funciones relacionadas están acomodados en clusters con espaciadores intergénicos (IGS) de longitudes variables. Los IGS del operón ribosomal son transcritos, y por esta razón son generalmente llamados espacios intergénicos transcritos (ITS). Se asume que las regiones IGS e ITS están menos sujetas a la presión selectiva y pueden acumular más mutaciones que los genes flanqueantes; por lo tanto son buenos candidatos para ser utilizados como herramientas moleculares que permiten discriminar entre cepas cercanamente relacionadas, además de que están presentes en todas las bacterias y la conservación de la secuencia de los genes funcionales permite la amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos “universales” sin tener que realizar un estudio preliminar de la genética de un nuevo microorganismo. A pesar de que los espacios existentes entre otros genes han sido estudiados para ser aplicados de la misma

forma (entre los genes *nifH* y *nifD*, y los genes *nifD* y *nifK* en Frankia) , el término ITS se refiere casi exclusivamente a los genes ribosomales.

En bacterias el orden común de los genes del operón rRNA es 16S-espaciador-23S-espaciador-5S. Los dos espaciadores internos transcritos tienen longitudes variables.

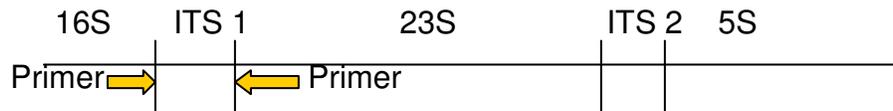


Figura 1.7. Disposición del operón de los genes ribosomales en bacterias.

El ITS 1 (localizado entre 16S y 23S) es el más grande y varía de longitud entre 169 y 1200 pb. o más dependiendo del género o grupo filogenético del que se trate. Este polimorfismo puede ser utilizado para tipificar bacterias sobre todo si son utilizadas conjuntamente las técnicas de PCR y RFLP (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción).

La tipificación se lleva a cabo amplificando por PCR el ITS utilizando primers que flanquean el espacio intergénico aprovechando las regiones conservadas de los genes 16S y 23S; al someter a electroforesis los productos obtenidos del PCR se pueden observar diferencias en el tamaño de los espacios intergénicos provenientes de diferentes cepas, cuando esto no es suficiente y se observan espacios intergénicos de tamaños similares se pueden digerir los productos de PCR con enzimas de restricción y los productos ser separados por electroforesis, lo cual dará como resultado patrones de bandas diferentes para cada cepa, esto hace la combinación de estas dos técnicas una herramienta poderosa de tipificación.

4. APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE LA DESNITRIFICACIÓN EN AGUAS.

Existe una gran cantidad de información y trabajos sobre microorganismos desnitrificantes en ambientes acuáticos naturales y plantas de tratamiento de aguas, en los cuales se ha explorado la conformación de las comunidades presentes y los factores que producen cambios en ellas (Ward,. 1993; Etchebere,. 2001).

La existencia de microelectrodos capaces de detectar los cambios en las concentraciones de oxígeno, nitrato, amonio y otros compuestos han facilitado una gran cantidad de experimentos en donde es posible monitorear las condiciones en

medios naturales y esto poderlo correlacionar la dinámica de las poblaciones desnitrificantes, por ejemplo la amplificación por PCR de genes o regiones específicas de genes ha mostrado que la presencia de *Alcaligenes xylosoxidans* se ve afectada por los cambios en las condiciones en lagos de agua dulce (Braker, 1998).

Las técnicas mas utilizadas para el estudio molecular de la desnitrificación son las basadas en PCR (DGGE) y las basadas en hibridación con sondas para genes desnitrificantes (marcaje radioactivo, FISH), lo cual ha aumentado el conocimiento de la distribución de esta capacidad en ambientes naturales (Bothe, 2000).

II. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la composición de las comunidades microbianas en medios naturales, se realizó en el pasado mediante la aplicación de técnicas microbiológicas clásicas, tales como el aislamiento en cultivos puros o enriquecimiento selectivo de los microorganismos de interés. Sin embargo, actualmente diversos estudios han establecido que dichas técnicas presentan varias desventajas y sesgos en cuanto a los resultados obtenidos (Stams, 1989), ya que en la actualidad se sabe que sólo es posible cultivar una fracción muy pequeña, entre el 1 y 10% de los microorganismos presentes en ambientes naturales (Wagner,. 1993).

La Ecología Microbiana Molecular ha expandido considerablemente el conocimiento de la diversidad microbiana en los ambientes naturales revelando la existencia de una cantidad insospechada de bacterias no cultivadas (Ramírez-Saad,. 1999).

Esta metodología puede resultar de gran valor para evaluar los cambios en estructura y composición que ocurren en las comunidades microbianas involucradas en diversos procesos biotecnológicos, tales como la nitrificación y desnitrificación de aguas residuales en reactores. Además, este nuevo enfoque permite la posibilidad de detectar grupos microbianos específicos presentes en ambientes complejos, sin necesidad de emplear las técnicas tradicionales de aislamiento y cultivo.

III. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo General.

Ampliar el conocimiento sobre las características y el comportamiento de las comunidades microbianas presentes en ambientes complejos, como lo son los reactores de nitrificación y desnitrificación para el tratamiento de aguas residuales, lo que puede ser utilizado para eficientar estos procesos.

Objetivos específicos.

1. Aislar cepas con capacidad desnitrificante a partir de los lodos activados del reactor desnitrificante y caracterizarlas.
2. Establecer mediante DGGE el perfil de bandas de las comunidades microbianas que intervienen en los procesos de nitrificación y desnitrificación en reactores para el tratamiento de aguas residuales.
3. Determinar los cambios en composición y estructura de la comunidad microbiana que ocurren en los reactores en función del tiempo y de los cambios en las concentraciones de compuestos nitrogenados en las aguas a tratar.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Operación de los reactores.

En la planta piloto de tratamiento de aguas residuales de la UAM-Iztapalapa se encuentran trabajando en serie tres reactores para el tratamiento de las aguas residuales producidas por la misma universidad, son un reactor metanogénico de 3.6 litros de capacidad, un reactor nitrificante que tiene una capacidad de 2.4 litros y el desnitrificante de 1.28 litros.

El agua es tratada primeramente por un reactor metanogénico cuya principal función es la descomposición de la mayoría de la materia orgánica presente, este reactor se encuentra en condiciones anaerobias.

El eflujo del reactor metanogénico sirve para alimentar un reactor desnitrificante operado en condiciones anóxicas, el cual también tiene un influjo proveniente de un reactor nitrificante. El motivo por el cual este reactor se encuentra inmediatamente después del reactor metanogénico es que opera bajo condiciones anóxicas, además de que se consume la escasa materia orgánica remante del proceso metanogénico, ya que para que se lleve a cabo la nitrificación es requerida la ausencia de materia orgánica.

Una vez que el agua sale del reactor desnitrificante pasa al reactor nitrificante que opera en condiciones aerobias y en el cual el amonio es biotransformado en nitrato, una parte del agua que ha pasado por este reactor es bombeada hacia el reactor desnitrificante, mientras que otra parte va hacia la salida final del sistema (Figura 2.1).

sembrarlas otra vez en medio desnitrificante con 1.5% de agar en cajas Petri y dejar crecer por tres días y una vez transcurridos se aislaron aquellas colonias que a nivel macroscópico presentaban características diferentes.

4.4 Extracción de DNA de la cepas desnitrificantes.

Las cepas aisladas fueron sembradas en caldo de soya tripticaseína, cultivadas 48 horas a 30 °C la biomasa obtenida se utilizó para extraer DNA utilizando el Kit Wizard Genomic DNA (Promega Inc, Madison) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.5 Tipificación de los aislados por amplificación del espacio intergénico 16S-23S y su digestión con enzimas de restricción (ITS-REA).

Del DNA extraído a las cepas aisladas se amplificó por PCR el espacio intergénico 16S-23S utilizando los primers pHr con secuencia 5' TGCGGCTGGATCACCTCCTT y p23SR01 con la secuencia 5' GGCTGCTTCTAAGCCAAC, calentado la mezcla de reactivos a 94°C por dos minutos seguido por un minuto más a la misma temperatura, la temperatura de anillamiento fue de 50°C por 30 seg y 72°C por 45 seg para la síntesis, esto repetido por 35 ciclos. Por último se puso por 6 minutos a 72°C para una síntesis completa.

Una vez amplificado el ITS fue digerido con las enzimas de restricción *HhaI* y *HaeII* utilizadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y los productos de la digestión fueron separados en un gel de agarosa al 2%.

4.6 Identificación de los aislados.

Las cepas desnitrificantes fueron identificadas por métodos bioquímicos mediante la utilización de la Galería API20 NE (Natural Environment), ya que este kit es el más adecuado para identificar cepas desnitrificantes, se siguieron a las instrucciones del fabricante y se utilizó el software de identificación de la compañía API versión 5.3.

4.7 Extracción del DNA de las muestras de lodo de los reactores.

La extracción de DNA del lodo de los reactores se llevó a cabo por la técnica de "bead-beating" que consiste en el rompimiento mecánico de las células por perlas de vidrio en agitación constante y severa, seguida de extracciones químicas con fenol y

solventes orgánicos. Brevemente: se centrifugan 10 mL de lodo a 15000 RPM por 15 minutos, el “pellet” fue resuspendido en 400 µL de buffer TE estéril y se agregaron 300 µL de perlas de vidrio de 0.11 mm de diámetro y 200 µL de fenol saturado con buffer TRIS HCL a pH 8, la mezcla se agitó a 5000 RPM durante 1 minuto en el “bead-beater”, se dejó enfriar 1 minuto en hielo y esto se repitió 4 veces más, se centrifugó 10 min a 9000 RPM, posteriormente se extrajo la fase acuosa con una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 primero y después con una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, una vez realizado esto se ajustó el volumen a 0.5 mL y se precipitó el DNA con 1 mL de etanol 96% y 50 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2, a -70°C de 30-60min. Se centrifugó a 10000 RPM por 15min, se lavó el “pellet” con etanol al 70% y se dejó secar y finalmente se disolvió el “pellet” en 100 o 50 µL de amortiguador TE. La integridad del DNA extraído se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

4.8 Amplificación del gen 16S y del fragmento de la región V6 a la región V8.

La amplificación del gen 16S se realizó por PCR para asegurar de la integridad de la muestras de DNA de los lodos y de las cepas aisladas utilizando los oligonucleotidos 8f con secuencia 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492r con la secuencia 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT el programa en el termociclador comprendió los pasos de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguidos por otros 30 seg de desnaturalización, anillamiento a 50°C por 20 seg y síntesis por un minuto y medio a 68°C, a partir del segundo paso hasta el cuarto se repiten por 35 ciclos y finalmente se dió un tiempo de 7 minutos para una síntesis total a 68°C.

La amplificación de la región V6-V8 del gen del 16S rDNA se realizó para su posterior análisis por DGGE y fue amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos 968GCfor con una secuencia rica en guaninas y citosinas para formar el “clamp” : 5'CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGACGCAAGAACC TTACC y el UNI1401rev con secuencia 5'GCGTGTGTACAAGACCC y programando en el termociclador los pasos: 94°C 5 min, 94°C 30 seg., 56°C 20 seg., 68°C 40 seg repetido 35 veces y finalmente 68°C por 7 min.

4.9 Separación de los amplicones V6-V8 de las cepas desnitrificantes aisladas y de las comunidades bacterianas de los reactores nitrificante y desnitrificante por DGGE.

Para obtener una huella genómica de las comunidades presentes en los reactores a diferentes tiempos, los amplicones V6-V8 obtenidos por PCR fueron separados por DGGE en geles con un gradiente lineal desnaturalizante 44%-54% (en los cuales también fueron cargados los amplicones obtenidos de las cepas aisladas del reactor desnitrificante para determinar su importancia dentro de la comunidad de este reactor) (Muyzer, 1993).

Una vez preparado y montado el gel en el aparato DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, Hercules Calif.) se cargaron los productos V6-V8 mezclados con regulador de carga en relación 6:1, el volumen cargado varió de acuerdo con la concentración de DNA presente en la muestra y el origen de ésta (cepa o comunidad bacteriana) esto con la intención de colocar cantidades similares de DNA y se aplicó un voltaje de 200V por 5 minutos a 60 °C para introducir e igualar las muestras en el la parte del gel concentrador, posteriormente los geles fueron corridos por 16 horas a un voltaje constante de 85V a una temperatura de 60 °C.

Una vez pasadas las 16 horas los geles fueron revelados con plata siguiendo la técnica que se basa en la precipitación de la plata por la presencia de un agente reductor (Bromohidruro de sodio) en medio ácido.

4.10 Determinación de Amonio.

Se midió la concentración de amonio en los influentes y efluentes de los reactores utilizando un potenciómetro con un electrodo con membrana específica para el ion amonio y utilizando una curva estándar previamente obtenida (manual del usuario Cole-Parker).

4.11 Determinación de Nitrato.

La concentración de nitrato en el influente y el efluente del reactor desnitrificante se determinó en un equipo de electroforésis capilar de iones (Waters, Capilar Ion Electrophoresis) en base a una curva estándar previamente obtenida.

4.12 Determinación del crecimiento microbiano de los aislados desnitrificante en condiciones de laboratorio.

El crecimiento microbiano se obtuvo determinando proteína total en el medio de crecimiento a diferentes tiempo por 3 días utilizando el micro método de Bradford con el “kit” para la determinación de proteínas totales de BioRad siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.13 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias entre las capacidades de desnitrificación de las cepas aisladas utilizando el programa estadístico NCSS versión 6.0.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Aislamiento, caracterización e identificación de cepas desnitrificantes.

Se aislaron cepas desnitrificantes con la intención de determinar su relevancia dentro del reactor desnitrificante, así como caracterizarlas e identificarlas. Con la utilización del medio de cultivo para desnitrificantes fue posible aislar seis cepas bacterianas con base en su morfología colonial (Cuadro 5.1) fueron consideradas como diferentes.

Aislado	Forma	Elevación	Textura	Borde	Color	Tamaño
1	Circular	Elevada	Húmeda	Irregular	Café translúcido	4 mm \varnothing
2	Circular	Elevada	Mucosa	Regular	Beige brillante	5 mm \varnothing
3	Circular	Elevada	Húmeda	Irregular	Beige opaco	2 mm \varnothing
4	Puntiforme	Cóncava	Seca	Regular	Café opaco	<1 mm \varnothing
5	Puntiforme	Elevada	Seca	Regular	Rojo opaco	1 mm \varnothing
6	Puntiforme	Elevada	Húmeda	Regular	Crema translúcido	1mm \varnothing

Cuadro 5.1. Morfología colonial de los seis aislados desnitrificantes obtenidos crecidos en agar sota tripticaseína.

Con la aplicación de técnicas moleculares a muestras de lodo y agua marina se ha encontrado que la cantidad de genes que codifican para funciones desnitrificantes es muy alto, lo cual indica que en la naturaleza existen muchas más especies desnitrificantes de las que se han podido aislar hasta el momento (Ward, 1993). Bundy (2002) hace referencia a diversos trabajos en donde se han obtenido aislados desnitrificantes a partir de ambientes naturales como suelo y agua marina en donde el número de aislados obtenidos es de 4 a 12 a pesar del uso de diferentes medios de aislamiento que difieren principalmente en las proporciones de los elementos minerales que los componen (Bund, 2002) y tomando en cuenta que Wagner (1993) calcula que sólo del 1% al 10% de las bacterias en ambientes naturales son cultivables era esperado por nosotros obtener un número de aislados que se

encontrara en el rango de 4 a 12. En nuestro caso es probable que se aislaran más desnitrificantes (por ejemplo si se hubieran hecho un número mayor de intentos de aislamiento) pero con el criterio de diferenciación que podía ser utilizado hasta este punto no era posible determinarlo.

Dado que la morfología colonial no es un criterio estricto para poder considerar nuestros seis aislados como cepas diferentes, era necesario tipificarlas con un método más confiable, por lo tanto se utilizó la técnica ITS-REA con la cual es posible diferenciar cepas filogenéticamente muy cercanas.

La digestión de los amplicones del ITS de los aislados se llevó a cabo con las enzimas *HhaI* y *HaeIII* las cuales reconocen secuencias de cuatro pares de bases para realizar cortes. Los patrones de digestión obtenidos con ambas enzimas para cada cepa fueron diferentes ya que los fragmentos obtenidos mostraron tener pesos diferentes (Figura 5.2), lo cual corroboró que los aislados son diferentes no sólo a nivel macroscópico sino también molecular. Bajo este punto de vista, se procedió a identificar y caracterizar todos los aislados.

La identificación se realizó en base a las capacidades bioquímicas de los aislados (utilización de fuentes de carbono, capacidades respiratorias) y su comparación con una base de datos con la información de cepas conocidas, tomándose como una identificación confiable cuando se obtienen un porcentaje de identificación mayor a 95% y como una buena referencia identidades de 75%. Lo anterior se realizó utilizando la galería API 20NE.

Tres cepas fueron identificadas con un porcentaje de identidad mayor al 98%, dos fueron identificadas con un porcentaje mayor de 75% y una presentó una identificación menor al 30% y fue considerada como no identificada y fue nombrada Dsn 1 (Tabla 5.3), cabe mencionar que incluso en casos los casos en los que se obtuvieron altos porcentajes de identificación los resultados fenotípicos deben ser confirmados por la secuenciación del gen 16S rDNA esto es especialmente necesario en cepas que provienen de medios complejos como lo son los reactores de tratamiento de aguas.

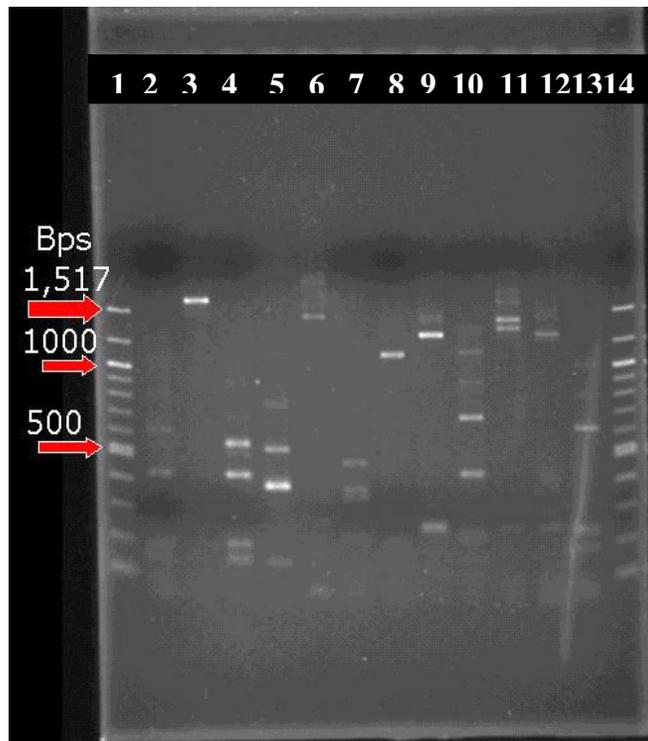


Figura 5.2. Productos de digestión del ITS de los aislados desnitrificantes digeridos con las enzimas de restricción II. Carriles: 1. y 14. Marcador molecular, 2. -7. ITS de los aislados digeridos con *HhaI*, 8. -13. ITS de los aislados digerido con *HaeII*.

Cuadro 5.3. Identificación de los seis aislados desnitrificantes por medio de la galería API20NE.

Cepa	Porcentaje de identificación
Dsn1	< 30%
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	78.5%
<i>Chryseomonas luteola</i>	98.4%
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	98.4%
<i>Burkholderia cepacia</i>	99.4%
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	75.9%

Como era de esperarse todas las cepas mostraron ser capaces de utilizar el nitrato como aceptor de electrones y las cepas identificadas resultaron ser especies desnitrificantes comúnmente conocidas (*Chryseomonas luteola*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter johnsonii*) (Zumft, 1997)

5.2 Crecimiento de las cepas desnitrificantes.

El crecimiento de las cepas en medio desnitrificante fue determinado midiendo la concentración de proteína celular en el medio utilizando un método espectrofotométrico, debido al bajo metabolismo que presentan este tipo de microorganismos en medios de cultivo tan pobres, el crecimiento de estas bacterias es lento. Existen reportes que indican que generalmente las cepas con mejor crecimiento en condiciones de laboratorio no lo son en ambientes naturales (Wagner, 1994), esta información es de utilidad sobre todo si se está buscando una cepa que se pueda utilizar como modelo.

La cinética de crecimiento de las seis cepas fue muy similar (Figura 5.4), a pesar de que *Acinetobacter johnsonii* presentó mayor crecimiento a las 78 horas, estadísticamente no existe diferencia significativa en los valores de crecimiento determinado como mg de nitrato consumidos por mg proteína celular de las seis cepas a una α de 0.05.

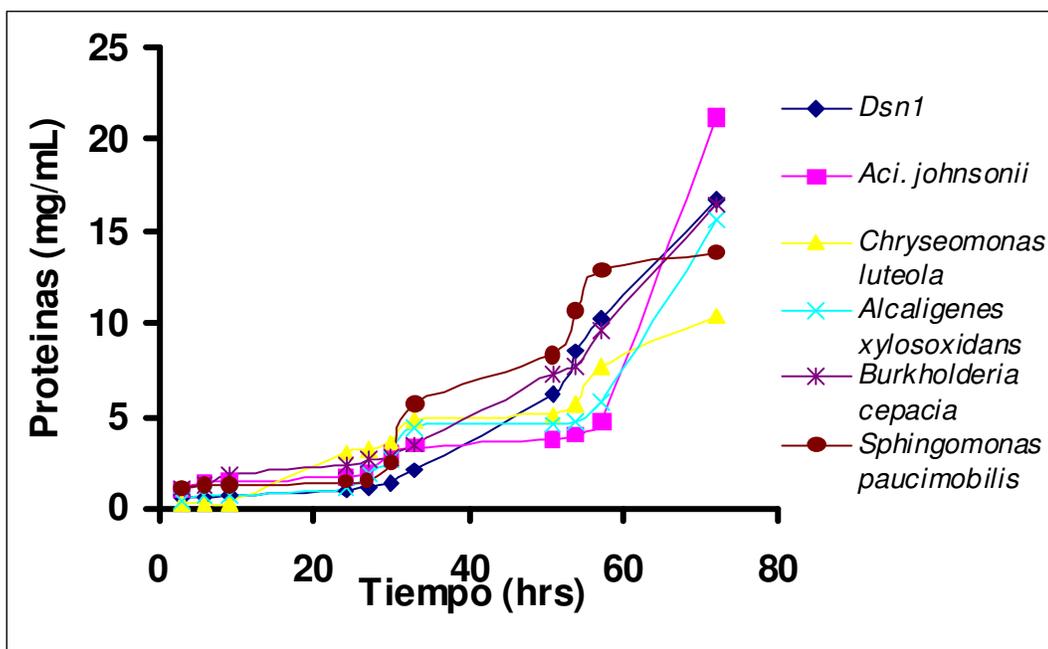


Figura 5.4. Crecimiento de las cepas desnitrificantes a las 78 horas de cultivo en medio desnitrificante.

5.3 Capacidad de consumo de nitrato de las cepas obtenidas.

El consumo de nitrato de las cepas se determinó a las 48 horas de cultivo, las pruebas se realizaron por triplicado y se utilizó un análisis de varianza como prueba estadística para determinar la existencia de una diferencia en la capacidades de consumo de nitrato (Tabla 5.5).

Se encontró que efectivamente existía una diferencia entre las capacidades de consumo de nitratos, por lo cual se aplicó una prueba de Tukey-Kramer, la cual arrojó como resultado que estadísticamente existe una diferencia significativa entre las capacidades de consumo de nitrato de *Chryseomonas luteola* y *Sphingomonas paucimobilis* siendo esta última menor con una significancia <0.05 , a pesar de que se observa una capacidad alta de la cepa de *Alcaligenes xylosoxidans* ésta no fue estadísticamente diferente. Se debe mencionar que al realizar las pruebas estadísticas, previamente se aplicó a los datos la prueba de bondad de ajuste de Omnibus para determinar que éstos fueran homocedásticos y normales, condiciones necesarias para poder realizar las pruebas estadísticas seleccionadas. Todas las

pruebas estadísticas fueron realizadas con la ayuda del software NCSS (el reporte de los datos se presenta en el anexo 1).

Cepa	Promedio de la capacidad de consumo de nitrato. (mg de nitrato consumido/ mg de proteína)
Dsn1	0.126 ^a
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0.117 ^a
<i>Chryseomonas luteola</i>	0.176 ^{ab}
<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	0.151 ^a
<i>Burkholderia cepacia</i>	0.063 ^a
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0.075 ^{ac}

Tabla 5.5. Capacidad de consumo de nitrato de los aislados a las 48 horas de crecimiento. Diferencias significativas entre ab-ac según la prueba de Tukey-Kramer. sig.< 0.05 n=3.

Es reconocido que las cepas desnitrificantes tienen una velocidad de crecimiento baja (Rolston, 1976) y es raro que presenten diferencias importantes en la velocidad de su crecimiento debido al bajo metabolismo que emplean en condiciones desnitrificantes. Sin embargo, al determinar la capacidad de consumo de nitratos dos cepas mostraron tener diferencia entre sí, indicando que *Chryseomonas luteola* puede ser de interés para estudios de bioaugmentación debido a su mayor capacidad desnitrificante. Sin embargo, se debe determinar su importancia dentro de la comunidad, ya que no siempre se puede extrapolar al comportamiento de las cepas bajo condiciones de laboratorio a su comportamiento en las condiciones ambientales (Wagner, 1994).

5.4 Estructura de las comunidades bacterianas de los reactores y sus cambios en función del tiempo y las condiciones de operación.

5.4.1 Reactor nitrificante. Con la finalidad de determinar la eficiencia en la remoción de amonio del reactor nitrificante se midió la concentración de amonio en el agua de entrada y de salida como se describe en materiales y métodos (sección 4.1).

El reactor nitrificante tuvo un periodo de adaptación previo a la alimentación con amonio, este periodo consistió en el proceso de alimentación con agua residual producida en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, la cual ya contiene amonio. Las mediciones de la eficiencia del reactor se realizaron sólo después de la alimentación extra de amonio, lo cual es el tiempo cero en la Figura 5.6.

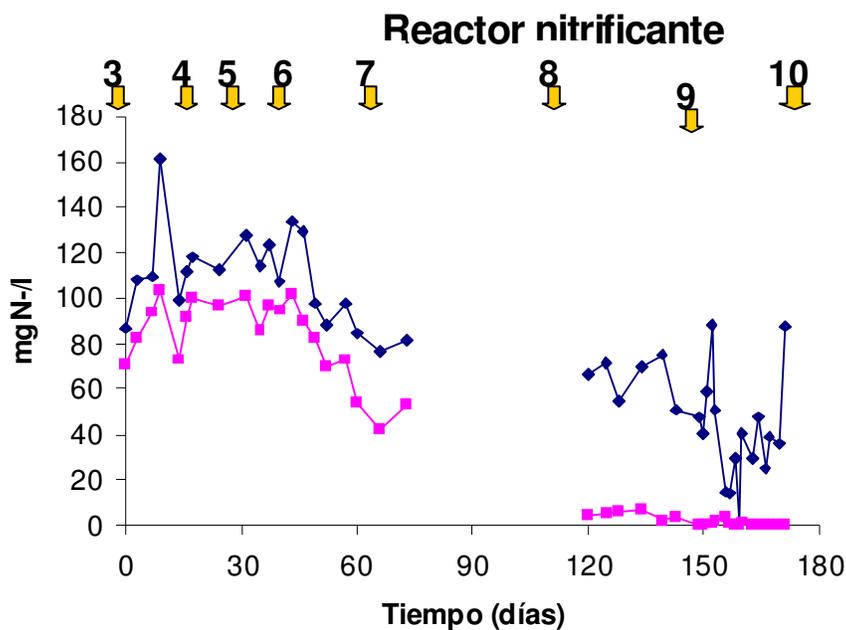


Figura 5.6. Comportamiento del consumo de amonio dentro del reactor nitrificante a través del tiempo a partir de la alimentación extra de amonio (tiempo 0). Los números y las flechas señalan el carril de la figura 5.8 de la comunidad bacteriana que corresponde con ese momento de la operación del reactor.

En los primeros días, la eficiencia del reactor se encontraba en el rango de 15% a 20%, lo cual era muy bajo para este tipo de sistemas, se esperaba que existiera un periodo de adaptación a la nueva carga de amonio y que progresivamente aumentaría la eficiencia con el paso del tiempo, pero esto no se observó. Después de un período en donde fue necesario detener la operación del reactor para realizar ajustes y en donde se dejó también un periodo de readaptación (días 90-117) y se

volvió a medir la eficiencia del reactor con condiciones de una mayor aireación en donde se observó que la eficiencia rondaba el 90%.

También se determinó la estructura de la comunidad bacteriana presente en los lodos del reactor nitrificante a diferentes tiempos y tratando de documentar los cambios que sufrió en el tiempo y por las condiciones duración (Figura 5.7).

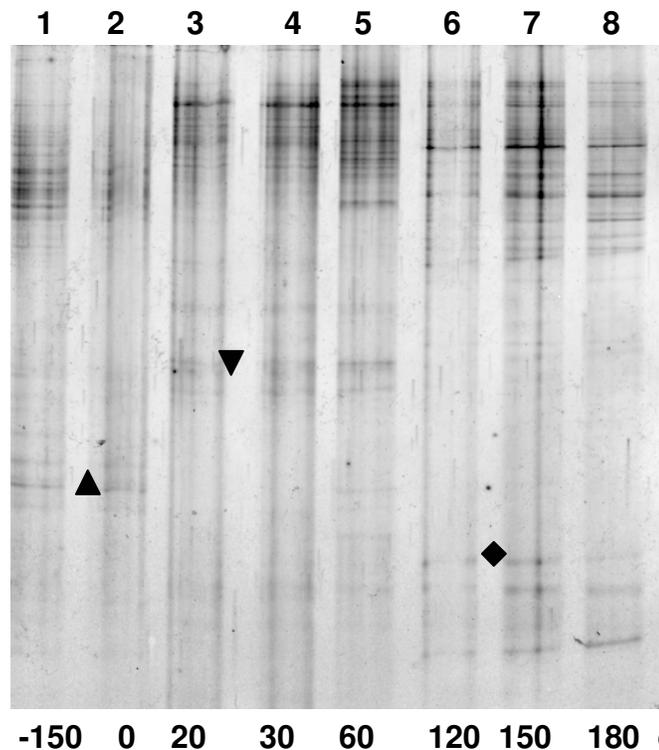


Figura 5.7. Separación por DGGE de amplicones de la región V6-V8 del gen 16S rDNA de la comunidad bacteriana del reactor nitrificante a través del tiempo. Carriles 1 y 2 perfiles de la comunidad bacteriana a los 150 y 0 días previos a la alimentación con amonio. Carriles 3-5 perfiles de la comunidad a los 20, 30 y 60 días posteriores a la alimentación con amonio. Carriles 6-8 perfiles de la comunidad bacteriana a los 120, 150 y 180 días posteriores a la alimenticio con amonio.

La comunidad bacteriana presentó un perfil característico y muy estable antes de la carga de amonio extra, lo cual muestra a una comunidad bacteriana bastante definida y adaptada a esas condiciones.

A partir de la alimentación con amonio extra (Fig 5.7, carril 3), se observó un cambio en la estructura de la huella genómica de la comunidad presente en el reactor, ya a partir de los 30 días pues se observaron poblaciones que prácticamente pierden su presencia dentro de la comunidad (triángulo), mientras que otras, cuyas bandas no

destacaban en los perfiles del periodo de adaptación, en los perfiles obtenidos posteriores a la alimentación con amonio se observan como poblaciones importantes dentro de la comunidad (triángulo invertido). El perfil de la comunidad se modificó cuando se volvieron a cambiar las condiciones de operación y que fue el momento en que aumentó la eficiencia del reactor, lo que se nota en los carriles que pertenecen a la comunidad después de los 120 días en donde hay bandas no observadas anteriormente (rombo).

Existen algunos reportes de estudios en comunidades bacterianas de reactores que detectaron cambios en la estructura de estas una vez que se cambian las condiciones de operación, ya sea la carga de COD (Calli, 2003), el material de soporte (Tanaka, 2003), o agentes químicos (Boon, 2003). De acuerdo a lo anterior, también observan un cambio en la eficiencia de remoción de contaminantes, lo cual se relaciona con un perfil determinado de la comunidad. Lo anterior fue observado en este trabajo, confirmando el hecho de que la eficiencia no está relacionada al comportamiento o cantidad de una sola especie, sino más bien al conjunto de poblaciones diferentes que conforman una comunidad bacteriana y que guardan una proporción específica respecto a su número dentro de esta comunidad (perfil de la comunidad) (Rowan, 2002; Kreutzinger, 2003; Zhang, 2004). También hay que mencionar que una diversidad microbiana mayor no significa necesariamente una oxidación mayor de amonio, por lo cual es necesario combinar el análisis molecular con las determinaciones químicas (Xia, 2005).

5.4.2 Reactor Desnitrificante. Se obtuvieron las eficiencias de remoción de nitrato para el reactor desnitrificante midiendo la concentración de nitrato a la entrada y a la salida del reactor (materiales y métodos), para determinar las condiciones adecuadas de operación e identificar la comunidad bacteriana relacionada con los momentos de mayor eficiencia.

Al igual que el reactor nitrificante, el reactor desnitrificante tuvo un periodo de adaptación previo a la carga extra de nitrato, durante este periodo de adaptación fue alimentado con agua residual producida en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Posterior a este periodo de adaptación, el reactor se alimentó con la misma agua residual además de una carga extra de nitrato a partir del cual se comenzó a medir la eficiencia de remoción y que fue tomado como el tiempo cero (Figura 5.8).

Los primeros días la remoción de nitrato fue casi nula y aumentó paulatinamente hasta alcanzar valores de 30% alrededor del día 87, en que fue necesario detener su operación debido al ajuste de todo el sistema de reactores. Después de un periodo de readaptación, se continuó la medición de la eficiencia en donde se observó que aumentó hasta llegar aproximadamente al 75% de eficiencia de remoción el día 175 en el cual se dejó de determinar.

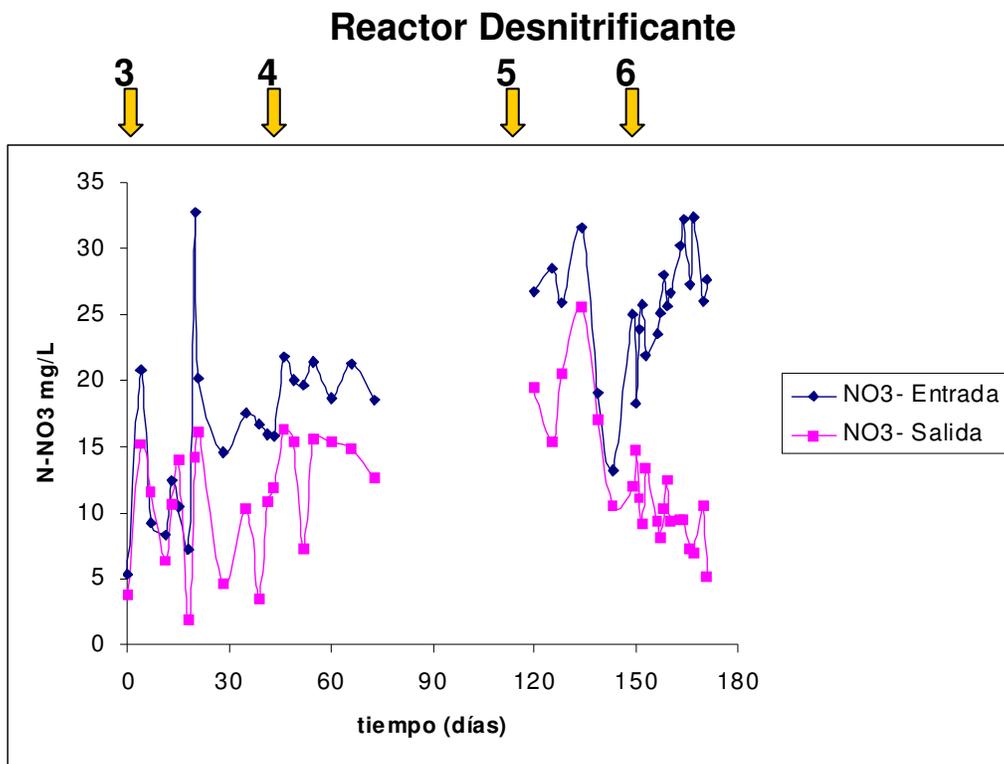


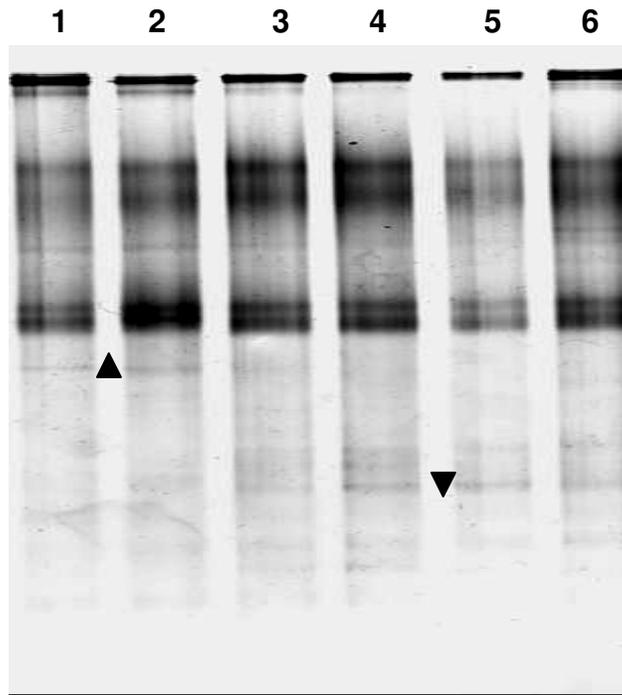
Figura 5.8 Comportamiento del consumo de nitrato dentro del reactor desnitrificante a través del tiempo a partir de la alimentación extra de nitrato (tiempo 0). Los números y las flechas señalan el carril de la figura 5.10 de la comunidad bacteriana que corresponde con ese momento de la operación del reactor.

La comunidad bacteriana del reactor desnitrificante tuvo un comportamiento similar a la del reactor nitrificante, en el periodo anterior a la carga extra de nitrato (-150 días). Es decir, los perfiles de DGGE de la comunidad bacteriana presente en este reactor

son muy similares en los diferentes tiempos (Figura 5.9). Así mismo, las mediciones de las variables del reactor durante este periodo no variaron, indicando la estabilidad del sistema (Figura 5.8). A los 45 días de la carga extra de nitrato ya se observó un cambio en el perfil de la comunidad bacteriana, el cual se mantuvo hasta el final del estudio, demostrando ser muy estable.

Se observaron poblaciones dentro de la comunidad que fueron de importancia durante el periodo de adaptación y que desaparecieron del perfil una vez que se comenzó a poner una carga extra de nitrato (triángulo), mientras que también se observó el fenómeno contrario en donde las poblaciones que aparecían en los perfiles de los tiempos de adaptación mostraron ser relevantes una vez que la carga de nitrato aumentó (triángulo invertido) lo cual las hace de interés para investigarlas ya que parecen aprovechar las condiciones cuando la concentración de nitrato es alta.

Yoshie (2002) reporta para la comunidad de un reactor desnitrificante, que el cambio de las condiciones de operación, como la concentración de nitrato, la temperatura y la fuerza iónica tienen efecto sobre la estructura de la comunidad bacteriana presente, lo cual es observado en este trabajo. Sin embargo, no se ha encontrado ningún reporte en donde se observe un aumento en la eficiencia de remoción y en donde la comunidad no se vea alterada, como fue el caso de este trabajo. Este fenómeno llama poderosamente la atención ya que aporta evidencia al hecho de que puede existir una adaptación paulatina de la comunidad a las condiciones y un aumento de la biomasa total presente en el reactor, sin que exista un cambio en la estructura de la comunidad.



-150 45 0 45 120 150 días

Figura 5.9. Perfiles de la comunidad bacteriana del reactor desnitrificante a diferentes tiempos. Carriles 1-3. comunidad bacteriana desnitrificante a los 150, 45, y 0 previos a la alimentación con nitrato. Carriles 4-6. Comunidad bacteriana a los 45 , 120 y 150 días posteriores a la alimentación con nitrato.

5.5 Identificación de los aislados desnitrificantes dentro de la comunidad bacteriana del reactor.

Con el propósito de establecer si la huella genómica de algunos de los seis aislados desnitrificantes obtenidos, correspondían con bandas de poblaciones prominentes en los perfiles de DGGE de la comunidad bacteriana del reactor desnitrificante, se corrió un gel con amplicones tanto de los aislados como de los perfiles del reactor a diferentes tiempos (Figura 5.10).

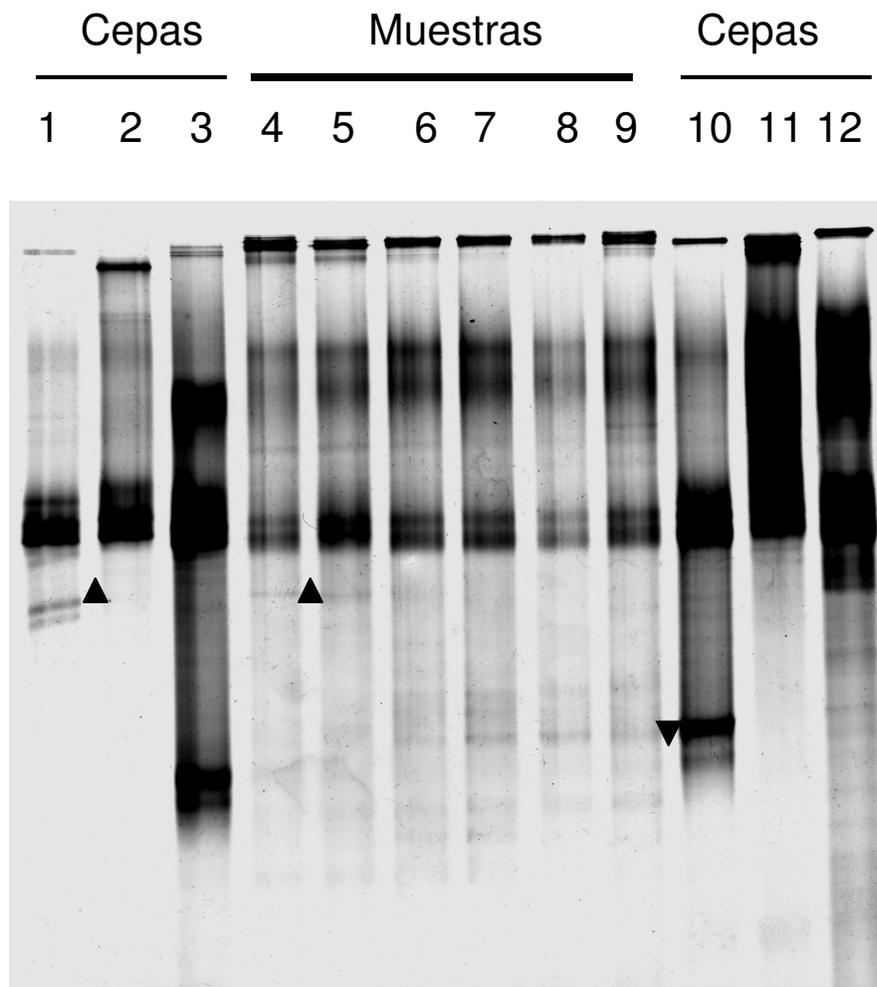


Figura 5.10. Presencia de los aislados desnitrificantes dentro de comunidad bacteriana del reactor a diferentes tiempos. Carriles 1-3. Cepas Dsn1, *Aci. Johnsonii*, *Chryseomonas luteola*, Carriles 4-6. Comunidad bacteriana desnitrificante a los 150, 45 y 0 días previos a la alimentación con nitrato. Carriles 7-9. Comunidad bacteriana desnitrificante a los 45, 120 y 150 días posteriores a la alimentación con nitrato. Carriles 10-12 cepas *Alcaligenes xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis*.

Se puede notar que la cepa nombrada Dsn1 presentó correspondencia con una banda importante (triángulos), dentro de los perfiles de la comunidad antes de que el reactor fuera alimentado con nitrato, mientras que todas las demás cepas no presentaron ninguna correspondencia con alguna banda observable dentro de estos perfiles. Sin embargo una vez que el reactor fue alimentado con nitrato, los perfiles de la comunidad cambiaron, desapareciendo la banda correspondiente con Dsn1, y apareciendo una banda que correspondió con la cepa *A. xylosoxidans* (triángulo

invertido), indicando que probablemente esta cepa en condiciones de concentraciones altas de nitrato y en condiciones de “operación normal” de un reactor de tratamiento de aguas tiene una presencia importante, lo cual la hace probablemente una de las cepas responsables de la desnitrificación dentro de este reactor, aun cuando este es el primer reporte de esta cepa como de importancia en la comunidad de un reactor. Es importante destacar que no siempre se cuenta con una cepa capaz de crecer y ser aislada en condiciones de laboratorio y que tenga una importancia dentro de la comunidad a la que pertenece y la cual es relevante en la biotransformación en plantas de tratamiento de aguas, sin embargo también hay que mencionar que los datos aquí obtenidos son apenas un primer acercamiento y que es requerido realizar más estudios, ya que la comparación de la movilidad relativa tiene limitaciones ya que se puede deber a otros factores y no sólo a una identidad entre los amplicones, lo cual puede inducir a errores, por lo cual en un trabajo a futuro será recomendable la secuenciación de las bandas para confirmar la identidad de las bandas con las cepas.

Por lo tanto la cepa de *Alcaligenes xylosoxidans* aislada en este trabajo, es de interés potencial para futuros estudios de bioaumentación, ya que ésta cepa tiene la capacidad de crecer en las condiciones del reactor y no sólo de laboratorio, el cual es uno de los principales problemas de aumentación, ya que las cepas que crecen bien, o que presentan altas capacidades de transformación en condiciones de laboratorio, no siempre tienen la capacidad de adaptarse y tener una importancia relevante dentro de las comunidades a las que son integradas (Boon, 2003), por otro lado también se debe mencionar que puede existir una población que se encuentre en un número bajo pero que puede ser muy activa y responsable del mayor porcentaje de biotransformación, mientras que una población que se encuentre en abundancia no implica que esté relacionada en la biotransformación de interés. Por lo anterior sería recomendable realizar un estudio *in situ* para determinar el nivel de actividad desnitrificante por la técnica FISH con sondas diseñadas para hibridar con mRNA del gen *Nir*. Si el caso fuera estudiar la actividad en el lodo nitrificante se podría utilizar la misma técnica utilizando una sonda para el gen *amoA*.

Las demás cepas desnitrificantes analizadas (incluida Dsn1) no tienen poblaciones de importancia dentro de los perfiles de la comunidad después de que el reactor fue alimentado con nitrato, esto corrobora la idea de que las bacterias capaces de crecer en condiciones de laboratorio no siempre tienen presencia importante dentro de la comunidad a la que pertenecen o juegan un papel importante en la biotransformación de compuestos contaminantes (Wagner, 1993).

VI. Conclusiones

6. CONCLUSIONES.

La eficiencia del reactor nitrificante fue pobre hasta que se aumentó la aireación, con lo cual se obtuvo una eficiencia de 95%.

El perfil de la comunidad bacteriana del reactor nitrificante cambió una vez que se aumentó la concentración de amonio así como cuando se aumentó la aireación, indicando una relación entre los cambios de condiciones de operación y la estructura de la comunidad.

El reactor desnitrificante tuvo bajos niveles de eficiencia de eliminación de nitrato hasta el ajuste en el reactor nitrificante, lo cual hizo que paulatinamente aumentara la eficiencia hasta 75% al final del estudio.

El perfil de la comunidad desnitrificante sólo cambió cuando se aumentó la concentración de nitrato, mientras que se mantuvo igual a pesar del aumento de la eficiencia, lo cual aporta evidencia al hecho de que puede existir una adaptación y tal vez un aumento de biomasa de una comunidad sin que se vea afectada su estructura.

Se aislaron seis cepas desnitrificantes a partir del lodo activado de un reactor desnitrificante, se tipificaron por métodos moleculares y se identificaron por medio de galerías API.

La cepa Dsn1 al parecer tenía una presencia importante dentro de la comunidad del reactor desnitrificante mientras este operaba bajo condiciones moderadas de nitrato y se vio afectada por el aumento de la concentración de este, mientras que *Alcaligenes xylooxidans* al parecer aumenta su importancia dentro de la comunidad a concentraciones altas de nitrato.

La cepa *Alcaligenes xylooxidans* aislada en este trabajo puede ser de importancia para estudios de bioaumentación ya que mostró tener una presencia importante a concentraciones altas de nitrato.

La cepa *Chryseomonas luteola* presentó un consumo de nitrato alto en condiciones de laboratorio, aunque no mostró tener una presencia importante dentro de la comunidad bacteriana de la que fue aislada.

VII. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA.

Abeliovich A. (1992). "Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs." Appl. Environ. Microbiol. **53**: 754-760.

Abmus B., S. M., kirchhof G., Hutzler P., Hartman A., (1997). "Improved *in situ* tracking of rizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides." Microb. Ecol. **33**: 32-40.

Alexander M. (1977). Introduction to soil microbiology. New York, Wiley.

Alzerreca J., N. J., Klotz M., (1999). "The *amo* A operon in marine, ammonia-oxidizing gamma-proteobacteria." FEMS Microbiology Lett. **180**: 21-29.

Amann R, L. H., Wagner M. (1998). "Monitoring the community structure of waste water treatment plants: a comparison of old and new techniques." FEMS Microbiology Ecology **25**: 205-215.

Amman R., Ludwig W., Schleifer K., (1995). "Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiol. Rev. **59**: 143-149.

Aminuddin M., N. D. (1974). "Electron transfer during sulphide and sulphite oxidation in *Thiobacillus denitrificans*." Biochem. Biophys. Acta. **325**: 81-93.

Arrigo K., D. G., Gosselin M., Robinson D., (1995). "High resolution study of the platelet ice ecosystem in McMurdo sound, Antarctica: Biomass, nutrient, and production profiles within a dense microalgal bloom." Mar. Ecol. Prog. Ser. **127**: 1-3.

Auling G., P. F., Busse H., Karrasch S., Streichan M., Shon G., (1991). "Analysis of the polyphosphate-eliminating microflora in phosphorous -eliminating anaerobic-aerobic activated sludge system by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation." Appl. Environ. Microbiol. **57**: 3585-3592.

Baumann B., S. M., Zehnder A., Van der Meer J., (1996). "Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes." J. Bacteriol. **178**: 4367-4374.

Bell L., R. D., Ferguso S., (1990). "Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductase in *Thiosphaera pantotropha*: the periplasmic enzymes catalyzes the first step in aerobic denitrification." FEBS Lett. **465**: 85-87.

Berendes, F., G. Gottschalk, E. Heine-Dobbernack, E. R. B. Moore, and and B. J. Tindall. (1996). "*Halomonas desiderata* spp. nov., a new alkaliphilic,

halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works." Syst. Appl. Microbiol. **19**: 158-167.

Bock E., S. I., Stüven R., Zart D., (1995). "Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor." Arch. Microbiol. **163**: 16-20.

Bond P., H. P., Keller J., Blackall L., (1995). "Bacterial community structure of phosphate-removing activated sludges by sequencing batch reactors." Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1910-1916.

Boon N., T. E., Verstraete W., Siciliano S., (2003). "Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated sludge microbial community against a 3 chloroaniline shock load." Appl. Environ. Microbiol. **69**: 1511-1520.

Bothe H., J. G., Schloter M., Ward B., Witzel K., (2000). "Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments." FEMS Microbiol. Revs. **24**: 673-690.

Braker G., F. A., Witzel K., (1998). "Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples." Appl. Environ. Microbiol. **64**(3769-3775).

Braun C., Z. W. (1991). "Marker exchange of structural genes for nitric oxide reductase blocks on the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri*." J. Biol. Chem. **266**: 22785-22788.

Breemen N. (2002). "Nitrogen cycle: Natural organic tendency." Nature **415**: 381-382.

Bundy J., P. G., Campbell C., (2002). "Microbial communities in different soil types do not converge after nitrogen contamination." J. Appl. Microbiol. **92**: 276-288.

Calli B., T. N., Mertoglu B., Inanc B., Ozturk I., (2003). "Molecular analysis of microbial communities in nitrification and denitrification reactors treating high ammonia leachate." Environ. Sci. Health **38**: 1997-2007.

Cervantes F., P. J., Gómez J., (2000). "Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales." Rev. Latinoam. Microbiol. **42**: 73-82.

Cuervo F., M. F., Gutierrez M., Noyola R., Gomez J., (1999). "Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors." Wat. Sci. Tech. **40**: 123-130.

Daum M., Z. W., Papen H., Kloos K., Nawrath K., Bothe H., (1998). "Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*." Curr. Microbiol. **37**: 281-288.

Diaz M., W. B. (1997). "Sponge-mediated nitrification in tropical benthic communities." Mar. Ecol. Prog. Ser. **156**: 97-107.

Dickson T. (1980). Química enfoque ecológico, Limusa.

Einsle O, K. P. (2004). "Structural basis of denitrification." Biol. Chem. **385**: 875-883.

Etchebere C., E. I., Barrandeguy E., Dabert P., Moletta R., Muxi L., (2001). "Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors." FEMS Microbiol. Ecol. **35**: 259-265.

Ferguson S. (1998). "Nitrogen cycle enzymology." Curr. Opin. Chem. Biol. **2**: 182-193.

Findlay R. (1996). The use of phospholipid fatty acids to determine microbial community structure. Molecular Microbial Ecology Manual. Akkermans A. Dordrecht, Kluwer academic.

Frunzke, K., and O. Meyer., (1990). "Nitrate respiration, denitrification, and utilization of nitrogen sources by aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria." Arch. Microbiol. **154**: 168-174.

Gayon U., D. G. (1882). "Sur la fermentation des nitrates." C. R. Acad. Sci. **95**: 644-646.

Gayon U., D. G. (1886). "Reserches sur la reduction des nitrates par les infiniment petits." Mem. Soc. Sci. Phys. Nat. **3**: 201-207.

Glockner A., J. A., Zumft W., (1993). "Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (*NirS*-) of *Pseudomonas stutzeri*." Arch. Microbiol. **160**: 18-26.

Goregues CM, M. V., Bonin PC., (2005). "Molecular, Biochemical, and Physiological Approaches for Understanding the Ecology of Denitrification." Microbiol. Ecol. **Versión electrónica todavía no publicada.**

Hairaishi A., M. K., Kitamura H., (1989). "Characterization of the bacterial population structure in a anaerobic-aerobic sludge system on the basis of respiratory quinone profiles." Appl. Environ. Microbiol. **55**: 897-901.

Holmes A., C. A., Lidstrom M., Murrell J., (1995). "Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related." FEMS Microbiology Lett. **132**: 203-208.

Horz H., R. J., Lukow T., Liesack W., (2000). "Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amo A PCR products." J. Microbiol. Methods **39**: 197-204.

Huber, R., T. Wilharm, D. Huber, A. Trincone, S. Burggraf, H. König, and I. R. Rachel, H. Fricke, and K. O. Stetter., (1992). "*Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria." Syst. Appl. Microbiol. **15**: 340-351.

Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., Vries, S., VanLoosdrecht, M. C.M. and Kuenen, J., G. , (1997). "Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds." Antonie van Leeuwenhoek. **71**: 75-93.

Kloos K., H. U., Bothe H., (1998). "DNA-probing for genes encoding for denitrification, N₂-fixation and nitrification in bacteria isolated from different soils." Can. J. Microbiol. **44**: 181-185.

Klotz M., A. J., Norton J., (1997). "A gene encoding a membrane protein exist upstream of the *amoA/amo B* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon?" FEMS Microbiology Lett. **133**: 131-135.

Knowles, R. (1982). "Denitrification." Microbiol. Rev. **46**: 43-70.

Knowles R., N. D. (1994). "O₂ regulation of denitrification in *Flexibacter canadensis*." Can. J. Microbiol. **40**: 916-921.

Kobayashi M., M. Y., Takimoto A., Suzuki S., Maruo F., Shoun H., (1996). "Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion." J. Biol. Chem. **271**: 16263-16267.

Koops H., M. U. (1992). The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. The prokaryotes. B. A. New York, Springer Verlag: 2625-2637.

Kowalchuk GA, N. Z., Derikx PJ, Felske A, Stephen JR, Arkhipchenko IA. (1999). "Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials." Appl. Environ. Microbiol. **65**: 396-403.

Kreutzinger N., F. A., Wandl G., Hornek R., Mash R., (2003). "Molecular biological methods (DGGE) as a tool to investigate nitrification inhibition in wastewater treatment." Water Sci. Tech. **47**(11): 165-172.

Kroneck, P. M., Beuerle, J. Schumacher, R. W., (1992). Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds. In: Metal ions in biological systems. AUS., Marcel Dekker Inc.

Limburg P., H. H., Witzel K., (2000). "detection of ammonia-oxidizing bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of *amo A* fragments." Appl. Environ. Microbiol. **66**: 1960-1969.

Logemann S., J. M. (1998). "A simplified denaturing gradient gel electrophoresis for the detection of sequence variations in PCR products." Biotechnol. Techniques **12**: 263-265.

Madigan M., P. J. (1998). Biología de los microorganismos, Prentice-Hall.

Manz W., W. M., Amman R., Schleifer K., (1994). "In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants." Water Res. **28**: 1715-1723.

Margulis L., L. J. (1974). "Biological modulation of the earth's atmosphere." Icarus **21**: 471-489.

Mesuel E. (1875). "De la putrefaction produite par les bacteries en presence des nitrates alcalins." C. R. Acad. Sci. **81**: 533-534.

Metcalf E. (1991). "Wastewater engineering: treatment disposal reuse", Mc Graw Hill Interamericana.

Michalski W., N. D. (1985). "Molecular characterization of a copper-containing nitrite reductase from *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma *spp. denitrificans*." Biochem. Biophys. Acta. **130**: 130-137.

Moir J., W. J., Spiro S., Richardson D., (1996). "The biochemical characterization of a novel non-haem iron hydroxylamine oxidase from *Paracoccus denitrificans* GB17." Biochem. J. **319**: 823-827.

Muyzer G., d. W. E., Uitterlinden A., (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Appl. Environ. Microbiol. **59**: 695-700.

Perez T. (1998). "Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario." Tesis de Maestría UAM-Iztapalapa.

Pike E., C. C. (1971). The microbial ecology of the activated sludge process. Microbial aspects of pollution. Sykes J. London, Academic Press: 123-147.

Prakasam T., D. N. (1967). "Aerobic heterotrophic populations of sewage and activated sludge." Appl. Microbiol. **15**: 461-467.

Prescott L., K. D. (1999). Microbiología, Mc Graw Hill Interamericana.

Ramírez-Saad H. (1999). Molecular Ecology of *Frankia* and other soil bacteria under natural and chlorobenzoate-stressed conditions. Microbiology. Wageningen, Wageningen Agricultural University.

Ramírez-Saad H., J. D., Akkermans A., (1998). "Root nodules of *Ceanothus caeruleus* contain both the N₂ fixing *Frankia* endophyte and phylogenetically related *Nod-/Fix-actinomycetes*." Can. J. Microbiol. **44**: 140-148.

Raskin L., P. L., Noguera D., Rittman B., Stahl D., (1994). "Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization." Appl. Environ. Microbiol. **60**: 1241-1248.

Robertson L., v. N. E., Torremans R., Kuenen J., (1998). "Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat culture of *Thiosphaera pantotropha*." Appl. Environ. Microbiol. **54**: 2812-2818.

Rolston D., F. M., Goldhamer D., (1976). "Denitrification measured directly from nitrogen and nitrous oxide gas fluxes." Soil Sci. Soc. Am. J. **40**: 259-266.

Rotthauwe J., W. k., Liesack W., (1997). "The ammonia monooxygenase structural gene *amo A* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations." Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4704-4712.

Rowan A., S. J., Fearnside D., Curtis T., Barer M., Head I., (2002). "A comparison of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in full-and laboratory-scale wastewater treatment reactors." Wat. Sci. Tech. **46**: 319-322.

Samuelsson, M.-O. (1985). "Dissimilatory nitrate reduction to nitrite, nitrous oxide, and ammonium by *Pseudomonas putrefaciens*." Appl. Environ. Microbiol. **50**: 812-815.

Semrau J., C. A., Lebron J., Costello A., Davagnino J., Kenna E., Holmes A., Finch R., Murrel J., Lidstrom M. (1995). "Particulate methane monooxygenase genes in methanotrops." J. Bacteriology. **177**: 3071-3079.

Siddiqui R., W.-E. U., Hengsberger A., Schneider B., Kostka S., Friedrich B., (1993). "Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16." J. Bacteriol. **175**: 5867-5876.

Smith J. (1934). "Bulking of activated sludge." Sew. Works J. **6**: 1041-1053.

Smith R. (1897). "On the examination of water for arganic matter." Manchester Lit. Philos. Soc. Mem. Ser. **3**: 37-88.

Sorokin D. (1998). "On the possibility of nitrification in extremely alkaline soda biotpes." Microbiology **67**: 335-339.

Stams F., G. J. Z. A. (1989). Structure-function relationship in granular sludge. Japan, ISME 5.

Stein L., A. D. (1998). "Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite." Appl. Environ. Microbiol. **64**: 4098-4102.

Straub, K. L., M. Benz, B. Schink, and F. Widdel., (1996). "Anaerobic, nitratedependent microbial oxidation of ferrous iron." Appl. Environ. Microbiol. **62**: 1458-1460.

Tanaka J., S. K., Watanabe K., Izumida H., Harayama S., (2003). "Activity and population structure of nitrifying bacteria in an activated sludge reactor containing polymer beds." Environ. Microbiol. **5**: 278-286.

Taske A., A. E., Regan J., Toze S., Rittman B., Sthal D., (1994). "Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite- oxidazing bacteria." J. Bacteriology. **176**: 6623-6630.

Thomsen K., G. T., Cox P., (1994). "Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*." Appl. Environ. Microbiol. **60**(536-541).

Van Rijn T., T. Y., Barak Y., (1996). "Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor." Appl. Environ. Microbiol. **62** 2615-2620.

Vo"lkl, P., R. Huber, E. Drobner, R. Rachel, S. Burggraf, A. Trincone, and and K. O. Stetter. (1993). "*Pyrobaculum aerophilum* spp. nov., a novel nitratereducing hyperthermophilic archaeum." Appl. Environ. Microbiol. **59**: 2918-2926.

Volsch A., N. W., Geiss H., Nebe G., Birr C., (1990). "Detection and analysis of two serotypes of ammonia oxidazing bacteria in sewage plants by flow cytometry." Appl. Environ. Microbiol. **56**(2430-2435).

Wagner M., A. R., Abrnus B., Hartmann A., Hutzler P., (1994). "In situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser microscopy." J. Microsc. **176**(181-187).

Wagner M., A. R., Lemmer H., Schleifer K., (1993). "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure." Appl. Environ. Microbiol. **59**: 1520-1525.

Ward B., C. A., Kilpatrick K., (1993). "Antibody and DNA probes for detection of nitrite reductase in seawater." J. Gen. Microbiol. **55**: 2285-2293.

Weston R. (1984). "Advanced waste treatment performance evaluation summary report." USEPA contract No. 68-03-3019.

Wilhelm R., A. A., Nejidat A., (1998). "Effect of longterm ammonia starvation on the oxidation of ammonia and hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*." J. Biochem. **124**: 811-815.

Xia S, S. Y., Fu Y, Ma X. (2005). "DGGE analysis of 16S rDNA of ammonia-oxidizing bacteria in chemical-biological flocculation and chemical coagulation systems." Appl. Microbiol. Biotechnol. **28**: 1-7.

Yoshie S., N. N., Miyano T., Tsuneda S., Hirata A., Inamori Y., (2002). "Characterization of microbial community in nitrogen removal process of metallurgic wastewater by PCR-DGGE." Water Sci. Tech. **46**(11): 93-98.

Zahn J., D. C., DiSpirito A., (1994). "Oxidation of Hydroxylamine by cytochrome p-460 of the obligate methylotroph *Methylococcus capsulatus* Bath." J. Bacteriology. **176**: 5879-5887.

Zennaro E., C. I., Cutruzzola F., Alessandro R., silvestrini M., (1993). "The nitrite reductase gene of *Pseudomonas aeruginosa*: effect of growth conditions on the expression and construction of a mutant by gene disruption." FEMS Microbiol. Lett. **109**: 243-250.

Zhang D, Z. D., Liu YP, Cao WW, Chen GX (2004). "Community analysis of ammonia oxidizer in the oxygen-limited nitrification stage of OLAND system by DGGE of PCR amplified 16S rDNA fragments and FISH." J. Environ Sci. **16**: 838-342.

Zumft W. (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 533-616.

VIII. ANEXOS

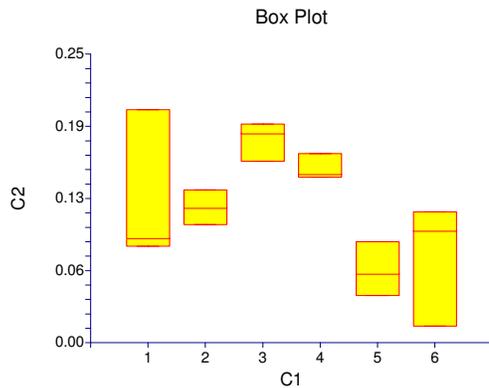
Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 23/04/03 05:02:47 p.m.
 Database C:\Mis documentos\José\hoja cepas.S0
 Response C2

Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	0.7466	0.455311	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	1.1886	0.234582	Accept
Omnibus Normality of Residuals	1.9703	0.373391	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.5300	0.749827	Accept

Box Plot Section



Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: C1		5	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		12	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: C1		5	2.826581E-02	5.653161E-03	4.05	0.021870*	0.806777
S(A)		12	1.674073E-02	1.395061E-03			
Total (Adjusted)		17	4.500654E-02				
Total		18					

* Term significant at alpha = 0.05

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 2 23/04/03 05:02:47 p.m.
 Database C:\Mis documentos\José\hoja cepas.S0
 Response C2

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

Ho: All medians are equal.
 Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.05)
Not Corrected for Ties	5	11.10526	0.049332	Reject Ho
Corrected for Ties	5	11.10526	0.049332	Reject Ho
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
1	3	28.00	9.33	-0.0592	9.099272E-02
2	3	29.00	9.67	0.0592	0.1171807
3	3	47.00	15.67	2.1917	0.1815789
4	3	40.00	13.33	1.3624	0.1461788
5	3	10.00	3.33	-2.1917	6.006136E-02
6	3	17.00	5.67	-1.3624	9.725276E-02

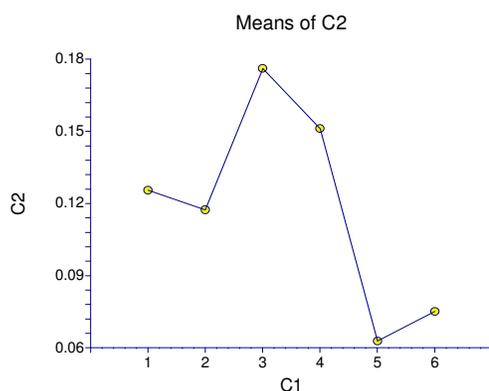
Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	18	0.1179697		3.932324E-02
A: C1				
1	3	0.1254789	2.156433E-02	8.615564E-02
2	3	0.1173093	2.156433E-02	7.798606E-02
3	3	0.1760872	2.156433E-02	0.1367639
4	3	0.1511167	2.156433E-02	0.1117935
5	3	6.276292E-02	2.156433E-02	2.343968E-02
6	3	7.506331E-02	2.156433E-02	3.574007E-02

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 3 23/04/03 05:02:47 p.m.
 Database C:\Mis documentos\José\hoja cepas.S0
 Response C2

Plots of Means Section



Bonferroni (All-Pairwise) Multiple Comparison Test

Response: C2
 Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=1.395061E-03 Critical Value=3.648889

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	3	6.276292E-02	3
6	3	7.506331E-02	
2	3	0.1173093	
1	3	0.1254789	
4	3	0.1511167	
3	3	0.1760872	5

Bonferroni (With Control) Multiple-Comparison Test

Response: C2
 Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=1.395061E-03 Critical Value=3.05454

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	3	6.276292E-02	3
6	3	7.506331E-02	3
2	3	0.1173093	
1	3	0.1254789	
4	3	0.1511167	
3	3	0.1760872	5, 6

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 4 23/04/03 05:02:47 p.m.
Database C:\Mis documentos\José\hoja cepas.S0
Response C2

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: C2
Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=1.395061E-03

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	3	6.276292E-02	3
6	3	7.506331E-02	3
2	3	0.1173093	
1	3	0.1254789	
4	3	0.1511167	
3	3	0.1760872	5, 6

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Response: C2
Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=1.395061E-03 Critical Value=2.178813

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	3	6.276292E-02	4, 3
6	3	7.506331E-02	4, 3
2	3	0.1173093	
1	3	0.1254789	
4	3	0.1511167	5, 6
3	3	0.1760872	5, 6

Newman-Keuls Multiple-Comparison Test

Response: C2
Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=1.395061E-03

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	3	6.276292E-02	3
6	3	7.506331E-02	3
2	3	0.1173093	
1	3	0.1254789	
4	3	0.1511167	

3 3 0.1760872 5, 6

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 5 23/04/03 05:02:48 p.m.
 Database C:\Mis documentos\José\hoja cepas.S0
 Response C2

Scheffe's Multiple-Comparison Test

Response: C2
 Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=1.395061E-03 Critical Value=3.940733

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	3	6.276292E-02	
6	3	7.506331E-02	
2	3	0.1173093	
1	3	0.1254789	
4	3	0.1511167	
3	3	0.1760872	

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C2
 Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=1.395061E-03 Critical Value=4.75026

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	3	6.276292E-02	3
6	3	7.506331E-02	
2	3	0.1173093	
1	3	0.1254789	
4	3	0.1511167	
3	3	0.1760872	5

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test

C2	1	2	3	4	5
1	0.0000	0.0765	1.4530	0.9177	1.3765
2	0.0765	0.0000	1.3765	0.8412	1.4530
3	1.4530	1.3765	0.0000	0.5353	2.8295
4	0.9177	0.8412	0.5353	0.0000	2.2942
5	1.3765	1.4530	2.8295	2.2942	0.0000
6	0.8412	0.9177	2.2942	1.7589	0.5353

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600
 Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 2.9352

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 6 23/04/03 05:02:48 p.m.
Database C:\Mis documentos\José\hoja cepas.S0
Response C2

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test

C2	6
1	0.8412
2	0.9177
3	2.2942
4	1.7589
5	0.5353
6	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 2.9352

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Determinación de la comunidad microbiana en biorreactores mediante técnicas de biología molecular”

PRESENTÓ

Q.F.B. José Antonio Velázquez Aragón

Director:

Dr. Hugo César Ramírez Saad
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Asesor:

Dr. Óscar Monroy Hermosillo
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor:

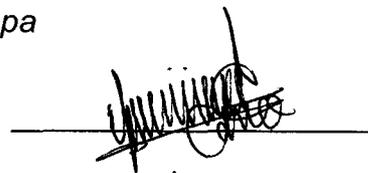
Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor:

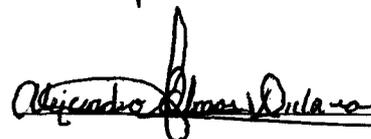
Dr. Edmundo BonillaGonzález
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Jurado:

Dr. Octavio Loera Corral (Presidente)
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Dr. Alejandro Olmos Dichara (Secretario)
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Dr. César Hugo Hernández Rodríguez (Vocal)
*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional*

