

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



**“ESTUDIO MOLECULAR DE LAS POBLACIONES DE UN LODO
ANAEROBIO EN CONDICIONES DESNITRIFICANTES Y
METANOGÉNICAS”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

EMIR MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

DIRECTOR:

JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ

Julio / 2004

AGRADECIMIENTOS:

A mi esposo, Delfino:

Por darme siempre su amor, comprensión y apoyo aún en momentos difíciles. Por alentarme día con día a cumplir mis metas y anhelos.
Gracias amor.

A mi bebita, Angélica:

Por llenar mi vida de alegría y ser el motivo que me impulsa a seguir día a día.
Gracias.

A mi mama, Alicia:

Por todo su apoyo y amor que me ha dado a lo largo de mi vida.
Gracias.

A mi papá, Jesús:

Que aunque ya no esta con nosotros, se que donde quiera que este me cuida y comparte mis alegrías
Gracias.

A mis suegros, Adela y Alfonso:

Por todo el apoyo que me han brindado
Gracias.

A mis hermanos por todo el apoyo y cariño que siempre he recibido.
Gracias.

Mi agradecimiento para:

Dr. Jorge Gómez Hernández
Dr. Francisco J. Fernández Perrino
Dra. Florina Ramírez Vives
Dr. Luis C. Fernández Linares
Dra. Natalie Cabirol

Por su asesoría y consejos para la realización de este trabajo

Mi gratitud para:

El Dr. Gustavo Viniegra y el Dr. Octavio Loera por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo, al permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio

A Ainhoa y Alejandro por todos sus consejos y apoyo.

A Edgar Sierra, Mónica Montiel y en especial a Arturo Pérez por la ayuda que me brindo en la realización de la hibridación. Gracias por su amistad y consejos

A mis compañeros y amigos de laboratorio:

Armando Peña, Alejandro Zepeda, Anne-Claire Texier, Felipe Martínez, Jaime Pérez, Sandra Islas, Sergio Martínez y Fernanda, por la amistad y apoyo recibidos.

A Laura Kawasaki, Ana Lidia Gómez y Lucila Mendoza por su apoyo, consejos y amistad.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana del departamento de biotecnología de la UAM- Iztapalapa con apoyo del CONACYT del proyecto 400 200 - 5 – Z019 – U

El presente trabajo recibió también apoyo del IMP a través del FIES – 98- 90 – 6 – SAP: D. 00037

Iztapalapa D.F. a 9 de julio de 2004

El jurado designado por la División de Ciencias biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presento:

Emir Martínez Gutiérrez

Director: Jorge Gómez Hernández

Jurado:

Asesor: Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Florina Ramírez Vives

Sinodal: Luis Carlos Fernández Linares

Sinodal: Nathalie Cabirol

Iztapalapa D.F. a 9 de julio de 2004

El jurado designado por la División de Ciencias biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presento:

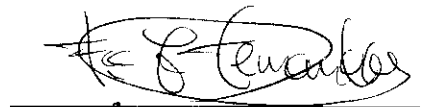
Emir Martínez Gutiérrez

Director: Jorge Gómez Hernández



Jurado:

Asesor: Francisco José Fernández Perrino



Asesor: Florina Ramírez Vives



Sinodal: Luis Carlos Fernández Linares



Sinodal: Nathalie Cabirol



INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. MARCO TEORICO	5
1.1-DESNITRIFICACION	4
1.1.1.- Bacterias desnitrificantes	6
1.1.2.- Bioquímica de la desnitrificación	8
1.1.2.1.- Nitrato reductasa	8
1.1.2.2.- Nitrito reductasa	9
1.1.2.3.- Óxido nítrico reductasa	11
1.1.2.4.- Óxido nitroso reductasa	12
1-1.3 .- Variables que afectan la desnitrificación	12
1.1.4.-Inhibidores	12
1.2.-METANOGENESIS	13
1.2.1.-Bacterias Metanogénicas.	13
1.2.2.- Fisiología de la metanogénesis	15
1.2.2.1.-Parte oxidativa	16
1.2.2.2.-Parte reductiva	18
1.2.2.3.- Reducción Heterodisulfuro con H ₂	18
1.2.3.- Inhibidores	18
1.3.- INTERACCIONES	19
1.4.- RECOMBINACIÓN GENETICA	21
1.5.- SEGUIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS	22
1.5.1. Número más probable (NMP)	22
1.5.2. Técnicas inmunológicas	23
1.5.3. Técnicas Moleculares	23
1.5.3.1. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos	23
1.5.3.2. Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) y técnicas derivadas	24
1.5.3.3. Procedimientos basados en el polimorfismo	26
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. OBJETIVOS	30
4. - MATERIAL Y METODOS	31
4.1. - Estabilización del proceso desnitrificante	31
4.2.- Aislamiento de bacterias desnitrificantes	32
4.3.- Estabilización del proceso metanogénico	33
4.4.-Métodos analíticos para el seguimiento del reactor	34
4.4.1. Compuestos nitrogenados	34
4.4.1.1. Cuantificación de amonio	34
4.4.1.2.- Cuantificación de nitrato (NO ₃ ⁻) y nitrito (NO ₂ ⁻)	35
4.4.1.3.- Nitrógeno y óxido nitroso	36
4.4.2.- Carbono Orgánico	38

4.4.3.- Biogás	39
4.5. –Método microbiológico	39
4.5.1. Número más probable	39
4.6.- Métodos moleculares	41
4.6.1.Extracción de ADN del lodo	41
4.6.2- Obtención de ADN bacteriano a pequeña escala	43
4.6.3.- Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	44
4.6.4.- Extracción de ADN del gel de agarosa	46
4.6.4.1 Extracción por QUIAEX	46
4.6.5. Clonación	48
4.6.6. Transformación de células competentes	49
4.6.7. Obtención de ADN plasmidico	49
4.6 .8. Transferencia, marcaje de sondas e hibridación de ácidos nucleicos	50
4.6.8.1. Transferencia de Southern	50
4.6.8.2. Marcaje de sondas	52
4.6.8.3. Hibridación	53
4.6.8.3.1. Prehibridación	53
4.6.8.3.2. Hibridación	53
4.6.8.3.3. Lavados	54
4.6.9. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)	54
5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1.- Estabilización del proceso desnitrificante	55
5.2.-Aislamiento de microorganismos desnitrificantes	57
5.3.- Estabilización del proceso metanogénico	60
5.4.- Análisis microbiológico	61
5.4.1.- Número más probable	61
5.5 .- Análisis molecular	62
5.5.1. Comparación de métodos de extracción de ADN del lodo	62
5.5.2. Obtención de una sonda para cuantificar las poblaciones desnitrificantes	64
5.5.2.1.Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	64
5.5.2.2. Extracción dl ADN de gel de agarosa	67
5.5.2.3 Clonación	67
5.5.3. Cuantificación de las poblaciones desnitrificantes en lodos	69
5.5.4.- Comparación cualitativa de las poblaciones presentes en distintos lodos anaeróbicos	71
6. CONCLUSIONES	75
7. BIBLIOGRAFÍA	77
Anexo A	91
Anexo B	93
Anexo C	94
Anexo D	95
Anexo E	96
Anexo F	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. El ciclo del nitrógeno	5
Figura 2. Vías para la formación de metil-CoM	17
Figura 3. Sistema de biorreacción	31
Figura 4. Curva estándar con concentraciones conocidas de nitrógeno de amonio	35
Figura 5. Curva estándar de N ₂ vs área del cromatografo	38
Figura 6.. Número más probable	40
Figura 7. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa	45
Figura 8. Perfil de comportamiento del acetato	55
figura 9. Perfil de los compuestos nitrogenados	56
Figura 10. Crecimiento en placa de la colonia C	58
Figura 11. Cinética del consumo de C- acetato de las cepas A, C y D	58
Figura 12. Cinética desnitrificante de las cepas A, C y D. Compuestos nitrogenados.	59
Figura 13. Perfil de compuestos carbonados en el proceso metanogénico	60
Figura 14. ADN obtenido por métodos a,b y c.	64
Figura 15. Barrido de temperaturas para la amplificación del gen <i>nirK</i> .	65
Figura 16. Barrido de temperaturas para la amplificación de <i>nirS</i>	66
Figura 17. Fragmento del gen <i>nirS</i> obtenido el método QUIAEX II	67
Figura 18.- Digestión de los clones 11, 16 y 32 con Eco RI	68
Figura 19. Digestión de lodo desnitrificante y metanogénico con EcoR1 y Not1	69
Figura 20. Southern e hibridación	70
Figura 21. Análisis por RAPDs del lodo	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución en bacterias de los distintos tipos de nitrito reductasas	11
Tabla 2. Medio de cultivo para el reactor en el proceso desnitrificante	32
Tabla 3. Medio de aislamiento para microorganismos desnitrificantes	33
Tabla 4. Medio de cultivo del reactor metanogénico	34
Tabla 5. Medio para el aislamiento de microorganismos metanogénico	40
Tabla 6. - Secuencias de los cebadores para nirS y nirK	46
Tabla 7. Sólidos suspendidos volátiles dentro del reactor y en el efluente	57
Tabla 8. Características de las bacterias aisladas	57
Tabla 9. Rendimiento desnitrificante de las colonias aisladas	60
Tabla 10. Cuantificación por NMP	62
Tabla 11. Comparación de los métodos de extracción de ADN	63

RESUMEN

En la naturaleza, las poblaciones microbianas que conforman una comunidad, o consorcios, interactúan entre sí, y cada población contribuye al mantenimiento de la misma, pero todavía hay muchas interrogantes acerca de los mecanismos involucrados que permiten la viabilidad del consorcio. También se piensa que cuando hay un cambio de condiciones ambientales hay cambios en la población a través de una sucesión de microorganismos distintos o de poblaciones microbianas. Hay también evidencias que señalan que, más que cambio en la población, puede haber un cambio metabólico de la población según las condiciones ambientales; o bien llevarse a cabo intercambios genéticos entre las poblaciones del consorcio.

En el presente trabajo, se operó un reactor con lodo desnitrificante, bajo condiciones desnitrificantes durante 220 días. La relación carbono nitrógeno (C/N) fue de 1.4. La velocidad de producción de N_2 fue de 455 ± 43 mg/Ld, por lo que la velocidad respiratoria estuvo en estado estacionario. En estas condiciones la eficiencia de consumo de nitrato fue de 99.86% y el rendimiento de nitrógeno molecular fue cercano a 1. Se tomaron muestras del lodo durante todo ese periodo, para cuantificar la población por medio del número más probable (NMP) y su análisis molecular posterior. Al mismo lodo se le cambiaron las condiciones de cultivo a metanogénicas, mediante el ajuste nutricional y el cambio de la C/N de 1.4 a 30. Se alcanzó el estado estacionario con una velocidad de producción de metano de 283 ± 21.8 mg C-CH₄ /L d. La efectividad del sistema fue similar a la del lodo desnitrificante. Se tomaron muestras del lodo para analizarlas molecularmente más tarde.

El NMP, para cuantificar la población desnitrificante y metanogénica, mostró que la población desnitrificante fue superior en dos ordenes de magnitud, respecto a la metanogénica, (6.9×10^{10} , 8.4×10^8 bacterias / gSSV, respectivamente) en el proceso desnitrificante. En el proceso metanogénico la población metanogénica fue superior en cuatro ordenes de magnitud con respecto a la desnitrificante. Estos resultados mostraron, que al cambiar las condiciones del reactor de desnitrificante a metanogénico, la población desnitrificante disminuye un orden de magnitud. Mientras que la población metanogénica, tuvo un cambio más grande, al aumentar cinco ordenes de magnitud su número.

De acuerdo al análisis por RAPD mostró que en el patrón de las bandas hubo un cambio en el número de microorganismos, ya que hubo una disminución de la población desnitrificante y un aumento de la metanogénica, cuando se cambió de proceso desnitrificante a metanogénico. El análisis de hibridación con la sonda correspondiente al gen *nirS* indicó resultados similares. La población desnitrificante disminuye durante la metanogénesis, ya que no es detectada con la sonda.

ABSTRACT

In nature the microbial populations form communities or consortia, which interact among them. Each population is related with the others and contribute to the survival of the whole populations. However, up to now it is not well understood which are the kind of mechanisms involved in the maintenance of viability of the consortia. It is also thought that when the environmental conditions change, the microbial population also change by means of a succession of different microorganisms or microbial populations. It is also said that when the environmental conditions are modified, rather than the microbial change, a metabolic change or genetic exchanges are seen among the microbial population.

In the present work it was operated a reactor with a denitrifying sludge during 229 days. The carbon nitrogen ratio (C/N) was of 1.4. The N₂ production rate was of 455±43 mg/ Ld. As the respiratory rate had a low variation the denitrification was under steady state. At these conditions the nitrate consumption efficiency was of 99.86% and the molecular nitrogen yield close to 1. In this all period of time a samples were taken to carried out the quantification of microorganisms using the more probable number (MPN) technique and later molecular analysis. A this same sludge was evaluated under methanogenic conditions, but the nutritional and the C/N ratio was fitted from 1.4 to 30. Under these new conditions the steady state was reached as the methane production rate was 283±21.8 mg C-CH₄ /L d. The effectiveness of the system was similar to that found in the denitrifying sludge.

The MPN for determining the denitrifying and methanogenic populations showed that the former was bigger than the latter in two order of magnitude (6.9 X 10¹⁰, 8.4 X 10⁸ bacteria / gVSS, respectively) throughout the denitrifying process. During the methanogenic process the methanogenic population was four order of magnitude higher than the denitrifying one. These results suggest that the change of the environmental conditions from denitrification to methanogenic, the denitrifying population decrease one order of magnitude, while the methanogenic population increased five orders of magnitude

The microbial analysis using the RAPD technique showed that the pattern bands changed, indicating that the kind of microorganisms also changed. The band patterns indicated that denitrifying populations decreased and increased the methanogenic population when the environmental changed from denitrifying to methanogenic process. The hybridizing analysis using the *nirS* probe showed a similar results. Namely, during the methanogenic process the denitrifying population decreased because the probe did not detect the corresponding gene.

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza coexisten numerosas poblaciones e interactúan unas con otras para formar una comunidad microbiana. Las comunidades microbianas utilizadas en los tratamientos industriales de aguas residuales son llamadas consorcios microbianos (lodos), los cuales son usados en diferentes procesos biológicos para eliminar o reducir los contaminantes.

Uno de los contaminantes cuya importancia es relevante es el nitrógeno, debido a que una gran cantidad de éste llega a diferentes cuerpos de agua en forma de nitrato, nitrito y de amonio, generando problemas de toxicidad para los organismos acuáticos, además de cambios ambientales como la eutroficación de los cuerpos de agua (Laws, 1993). La normatividad nacional vigente (NOM-001-ECOL-96) establece como límite máximo permisible 40 mg/L de nitrógeno total para las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores (SEMARNAP, 1997). En otros países (Estados Unidos de Norteamérica, Alemania, entre otros) el valor permitido es del orden de 5 mg N-NH₄⁺/L (Rushbrook y Urban, 1998). Muchas de las plantas de tratamiento de aguas residuales contribuyen a la emisión de óxido nitroso, el cual incrementa el efecto invernadero (Otte y col., 1996). El tiempo de residencia del óxido nitroso en la atmósfera puede ser de hasta 150 años (Kim y Craig, 1993).

Además del nitrógeno, existen compuestos orgánicos carbonados y compuestos reducidos de azufre, que llegan a encontrarse en diversas descargas de aguas residuales procedentes de diversas fuentes y en una variedad de formas.

En la actualidad el tratamiento de aguas residuales implica varios procesos, en los que se dice intervienen diferentes grupos de microorganismos, interaccionando entre sí. También se piensa que cuando hay un cambio en las condiciones ambientales ocurre lo que se conoce como sucesión de poblaciones. Otros trabajos, por el contrario, señalan que pueden ocurrir modificaciones en el metabolismo microbiano como respuesta a los cambios ambientales más que la mencionada sucesión poblacional (Reyes, 2000).

La información de la microbiota presente en los lodos de los reactores es escasa, por lo que se requiere información más profunda sobre el tema para poder entender la estabilidad de este ecosistema.

En el caso concreto de la desnitrificación y la metanogénesis son procesos respiratorios llevados a cabo por dos grupos microbianos distintos, los primeros pertenecen a las eubacterias y los segundos a las arqueobacterias. Estudios previos señalan que los dos procesos pueden ser llevados a cabo dentro de una misma unidad pero no al mismo tiempo (la metanogénesis empieza cuando la desnitrificación se ha completado). Una vez concluida la desnitrificación, el excedente de la fuente de carbono es convertida a metano (Balderston y Payne, 1976; Hanaki y Polprasert, 1989; Hendriksen y Ahring, 1996). La metanogénesis es inhibida por la presencia de nitrito y nitrato.

Dentro de este contexto, la finalidad del trabajo que a continuación se presenta fue contribuir al entendimiento del comportamiento dinámico de un consorcio microbiano al pasar de un proceso de desnitrificación a metanogénesis en estado estacionario.

2. JUSTIFICACION

Existe la idea generalizada, para la puesta a punto de reactores para el tratamiento de aguas residuales, de que es necesario establecer y estabilizar grupos microbianos especializados para llevar a cabo el proceso de depuración. Realizar esto, particularmente en reactores de gran tamaño, requiere de muchos meses o años. Evidencias en reactores piloto de laboratorio muestran que mediante el control del proceso respiratorio de los consorcios microbianos el tiempo requerido es sensiblemente menor. Como es frecuente asociar el tipo de metabolismo al tipo de microorganismos, se cree que cuando estos han crecido se tiene el proceso buscado. Sin embargo, en muchos procesos de laboratorio el crecimiento es tan pequeño que no es medible (en términos prácticos, considerando el balance de masas, no hay crecimiento de la población microbiana del consorcio). En consecuencia resulta difícil entender qué está ocurriendo en el reactor.

Existen hipótesis en ecología microbiana que tratan de explicarlo, mediante interrelaciones, como sinergismo, sintrofismo, entre otras, pero son interpolaciones de lo que se observa en cultivos axénicos. Son pocas las evidencias que muestran de manera directa que las interacciones microbianas permitan explicar el comportamiento de un consorcio, cuando hay un cambio de condiciones ambientales. Hay trabajos que señalan, como una posible explicación, un cambio en el metabolismo como respuesta a los cambios ambientales (Reyes, 2000). Bramuci y Nagarajan (2000) proponen que los microorganismos presentes en reactores de aguas residuales pueden ser usados como modelos de estudio para nuevas rutas metabólicas. Puede observarse, que todavía no se han podido identificar bien los factores que determinan la estabilidad de un ecosistema.

Además, en la literatura es frecuente la omisión de la fisiología cuantitativa del proceso respiratorio, no se hace referencia a la eficiencia, rendimiento, velocidad o al estado estacionario del consorcio. Esta información es inherente a cada cultivo y no puede ser soslayada. Es también frecuente asumir que los microorganismos son de metabolismo único, a pesar de que las evidencias muestran lo contrario. Debido a

que esta información se margina, es común asumir que si las condiciones ambientales cambian, el tipo y grupos microbianos dentro de un consorcio, también cambian. Es necesario, por lo tanto realizar más investigación que aporte evidencias sin omitir la información fisiológica cuantitativa. Por otro lado, las nuevas técnicas de análisis (y el empleo de equipos de mayor sensibilidad y rapidez) podrían aportar más datos sobre la ecofisiología de los consorcios microbianos. Los resultados podrían tener repercusiones relevantes y aplicación en el tratamiento de las aguas residuales, ya que en lugar de esperar a que se establezcan microorganismos especiales, con solo fijar condiciones ambientales, el metabolismo podría orientarse y ahorrar mucho tiempo en el arranque de los procesos de recuperación de dichas aguas.

En relación a la desnitrificación, se han realizado estudios con técnicas moleculares, para detectar o cuantificar la población desnitrificante presente en muestras ambientales, aunque la mayoría de estos análisis sólo han comprendido, muestras de agua o sedimentos marinos a diferentes tiempos (Braker y *col.*, 1998; Michotey y *col.*, 2000). Además, hay escasa evidencia de análisis microbiológico en los reactores tomando en cuenta el estado estacionario y pocos datos del seguimiento de esta población en reactores anaerobios.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar y analizar el comportamiento dinámico de un consorcio microbiano bajo dos procesos respiratorios en régimen estacionario: la desnitrificación y la metanogénesis.

Objetivos Particulares

Cuantificar, evaluar y comparar los cambios microbiológicos de un mismo consorcio que se presenten al pasar de la desnitrificación a la metanogénesis durante el estado estacionario.

- a) por medio de la técnica del número más probable.
- b) por medio de técnicas de biología molecular

1. MARCO TEORICO

Los procesos biológicos son comúnmente usados para el tratamiento de las aguas residuales industriales y domésticas. Su finalidad es la eliminación de la materia orgánica, nitrógeno, sulfuro y otros contaminantes que contienen las aguas residuales. Entre los procesos biológicos más importantes que se llevan a cabo en los reactores se encuentra la metanogénesis y la desnitrificación. Aunque hay estudios que revelan que estos dos procesos pueden llevarse a cabo dentro de la misma unidad, al parecer no se realizan de manera simultánea.

1.1. DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es una de las principales etapas del ciclo del nitrógeno. Este ciclo manifiesta la química redox inherente a las diversas formas en que el nitrógeno se desplaza en la naturaleza. Consta de las siguientes etapas: Fijación del nitrógeno, amonificación, asimilación, nitrificación y desnitrificación, las cuales se muestran de una forma simplificada en la Figura 1.

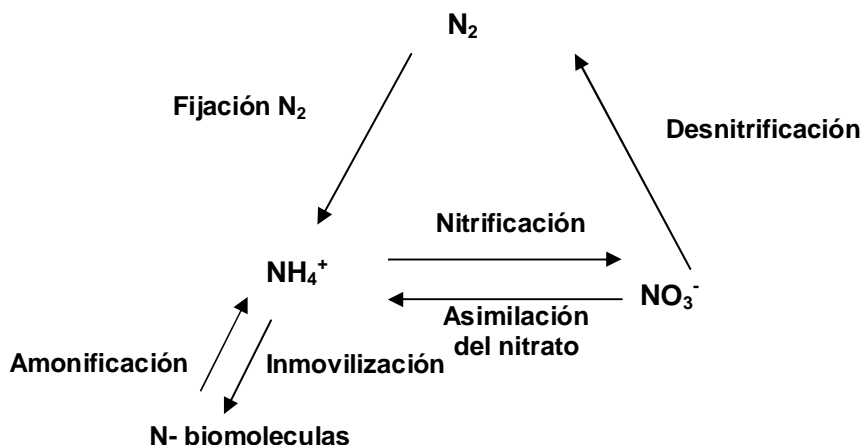


Figura 1. El ciclo del nitrógeno. La desnitrificación es un proceso que reduce el nitrato a N₂. El N₂ luego es convertido a NH₄⁺. La amonificación es la descomposición de los desechos orgánicos para producir NH₄⁺. En la nitrificación el NH₄⁺ es utilizado para formar NO₃⁻.

En la desnitrificación un óxido de nitrógeno sirve como aceptor de electrones para la generación de un gradiente electroquímico que atraviesa la membrana citoplasmática. La célula bacteriana dispone de óxido reductasas terminales que utilizan diferentes óxidos de nitrógeno, para la transformación secuencial de nitrato a N_2 (Zumft, 1997).

En términos fisiológicos, la desnitrificación es un proceso respiratorio anaerobio heterotrófico o litotrófico de tipo anóxico, que implica la reducción de nitrato (NO_3^-) hasta N_2 principalmente, aunque también pueden formarse y liberarse al ambiente óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) (Cervantes y col., 2000). En el proceso de respiración anóxica, la oxidación de la materia orgánica implica un mecanismo de oxido-reducción, en donde como parte final de la cadena de electrones se encuentra un aceptor de electrones diferente al O_2 (NO_3^- , CO_2 y SO_4^{2-}).

En la desnitrificación se requieren condiciones anóxicas por dos razones: En primer lugar porque la síntesis de las proteínas requeridas para la desnitrificación ocurre bajo condiciones anóxicas (Hochstein y Tomlison, 1988). En segundo lugar algunas de las reacciones de las reductasas son inhibidas en presencia de oxígeno en células intactas (Ferguson, 1994).

1.1.1. Bacterias desnitrificantes

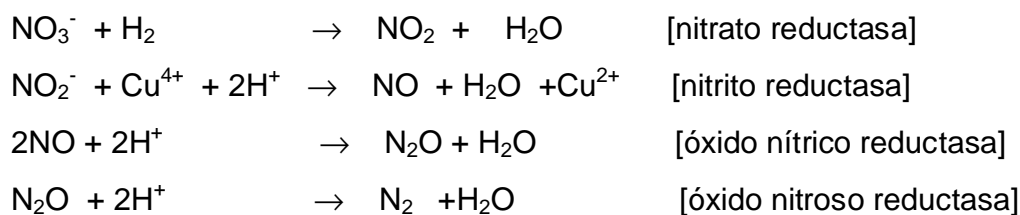
Estas son bacterias capaces de utilizar los óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones (proceso anóxico), en lugar del oxígeno. Desde el punto de vista bioquímico y taxonómico son muy diversas: algunas son heterotróficas, otras crecen de forma autotrófica en presencia de hidrógeno y CO_2 , o con compuestos reducidos de azufre. La mayoría posee todas las enzimas necesarias para reducir el nitrato a N_2 , pero algunas carecen de la nitrato reductasa y son dependientes del nitrito. A otras les falta la óxido nitroso reductasa y obtienen N_2O como producto final. Otros organismos poseen la N_2O reductasa pero no pueden producir N_2O del nitrato o

nitrito (Knowles, 1982). Puede decirse que la nitrito reductasa es la enzima clave de la desnitrificación al catalizar el primer paso en el que se produce un intermediario gaseoso (ver bioquímica de la desnitrificación, apartado 1.1.2)

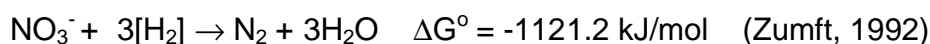
Muchas bacterias desnitrificantes pueden reducir el nitrato a N_2 en condiciones anóxicas, utilizando sustratos orgánicos, como metanol, etanol y acetato. La desnitrificación también puede ocurrir por medio de bacterias autotróficas del azufre (Oh y col., 2000), las cuales usan una variedad de compuestos reducidos de azufre (S^{2-} , S^0 , $S_2O_3^{2-}$), en vez de compuestos orgánicos, para reducir el nitrato. Se ha estudiado la desnitrificación autotrófica, en presencia de azufre o tiosulfato como donadores de electrones, empleando cultivos axénicos de *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Thiobacillus versutus*, *Thiosphaera pantotropha* y *Paracoccus denitrificans* (Timmer- Ten Hoor, 1981; Sublette y col., 1987; Visser y col., 1997; Chung y col., 1997; Till y col., 1998). Entre los géneros desnitrificantes más citados están: *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera* y *Bacillus*, por ejemplo (Cervantes y col, 2000). Sin embargo, se ha encontrado que algunas bacterias halófilicas y hipertermofílicas del dominio Archaea pueden llevar a cabo la desnitrificación y esto tiene un significado evolutivo importante que debería ser estudiado más a fondo, ya que se desconoce el mecanismo que utilizan para llevar a cabo el proceso. *Halobacterium marismortoi* fue la primera bacteria que mostró una producción de óxidos de nitrógeno a partir del nitrato (Werber y Mavarech, 1978). Otras arqueobacterias producen gas a partir del nitrato, como *Haloarcula* (antiguamente *Halobacterium*) *denitrificans* (Tomlinson y col., 1986), *Haloarcula hispanica* (Juez y col., 1986), *Haloarcula japonica* (Takashina y col., 1990) y *Halobacterium mediterranei* (Rodríguez-Valera y col., 1983), entre otros. No se sabe si las enzimas eubacterianas son iguales a las enzimas de las arqueobacterias, pero al parecer hay ciertas modificaciones, que hacen recomendable realizar estudios mas detallados.

1.1.2. Bioquímica de la desnitrificación

La desnitrificación es un proceso, en el cual el nitrato es convertido a N_2 de acuerdo con las siguientes reacciones:



Reacción General



La desnitrificación se puede considerar como un conjunto de reacciones enzimáticas sucesivas: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$. El NO fue el último intermediario descubierto (Zumft, 1993; Ye y col., 1994; Hollocher e Hibbs, 1996) y junto con el N_2O se conocen como intermediarios libres.

1.1.2.1. Nitrato reductasa (Nar, Nap)

Existen tres tipos de nitrato reductasas: una nitrato reductasa asimilatoria y dos nitrato reductasas desasimilatorias, aunque la primera se utiliza en el proceso asimilatorio del nitrato y las últimas en la desnitrificación (Fig 1). En el proceso asimilatorio se reducen los compuestos para satisfacer las necesidades nutritivas durante el crecimiento y en el metabolismo desasimilatorio se reduce una cantidad comparativamente mayor del aceptor de electrones, siendo liberado al medio el producto reducido.

La nitrato reductasa desasimilatoria es la enzima responsable de la reducción del NO_3^- a NO_2^- , el primer paso de la desnitrificación. Se han identificado dos tipos de nitrato reductasa desasimilatoria: una membranal de tres subunidades, con pesos moleculares de 140 KDa (α), 60KDa (β) y 25 KDa (γ) (Berks y col., 1995). La subunidad γ es un polipéptido unido a la membrana que contiene dos grupos hemo tipo b, tales grupos son considerados como los aceptores de electrones del ubiquinol y los transfieren a centros de Fe-S de la subunidad β , siendo por último se piensa que son transferidos al molibdeno del sitio activo en la subunidad α (Ferguson, 1994). La otra nitrato reductasa es una enzima soluble que se localiza en el periplasma y esta formada por dos subunidades (94 y 19 kDa).

La nitrato reductasa membranal (Nar) está ampliamente distribuida, encontrándose no sólo en bacterias desnitrificantes, sino también en muchas bacterias entéricas, como por ejemplo *E. coli*, en la cual ha sido ampliamente estudiada la respiración con nitrato (Berks y col., 1995).

La nitrato reductasa periplasmática (Nap) ha sido purificada a partir de α proteobacterias como *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Satoh, T., 1981) y *Thiosphaera panthotropha* (Berks y col., 1994) y también de β -proteobacterias como *Alcaligenes eutrophus* H16 (Siddiqui y col., 1993)

1.1.2.2. Nitrito reductasa (CuNir, cd₁)

El segundo paso de la desnitrificación es la reducción de nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO), reacción catalizada en cualquier organismo desnitrificante, mediante la nitrito reductasa desasimilativa. Se han identificado dos tipos de la enzima, ambos están localizados en el periplasma; una contiene cobre (CuNIR) y la otra el citocromo cd₁ (Jetten y col., 1997). La citocromo cd₁ (cd₁) ha sido ampliamente estudiada y es una proteína homodimérica periplasmática soluble en agua, que contiene dos grupos hemo por monómero (Cheesman y col., 1997). Cada subunidad contiene un grupo

hemo tipo c enlazado covalentemente y una molécula unida no covalentemente de un grupo hemo prostético d1 (Berks y col., 1995). Curiosamente el cd₁ también tiene actividad oxidasa. Ambas nitrito reductasas tienen un papel similar, es decir, son estructuralmente diferentes pero funcionalmente equivalentes (Glockner y col, 1993; Zumft, 1997). La enzima cd₁ ha sido ampliamente estudiada. Se piensa que los dos tipos de grupos hemo tienen distintos dominios y que por medio del grupo hemo d1 se cataliza la reacción de nitrito a óxido nítrico (Ferguson,1994).

La cd₁ está codificada por el gen *nirS*, mientras que la CuNir es codificada por el gen *nirK*. Se dice que los dos genes son mutuamente excluyentes en una cepa dada, pero ambos tipos se han encontrado en diferentes cepas de la misma especie (Coyne y col, 1989). La enzima cd₁ ha sido encontrada comúnmente y la actividad específica de la misma es más abundante en las muestras ambientales. La nitrito reductasa con cobre por el contrario parece estar distribuida en un mayor número de grupos de bacterias, incluida *Holobacterium denitrificans* (Ye y col., 1993). Cerca de tres cuartas partes de las cepas colectadas tienen la citocromo cd₁ (Gamble y col., 1977). En un estudio realizado por Coyne y col. (1989), se encontró que en 23 cepas de cultivos de colección hubo una predominancia de nitrito reductasa con cobre, pero numéricamente hubo más chito como cd₁.

La presencia de la nitrito reductasa con cobre puede ser determinada en un organismo en células intactas o extractos celulares, por la sensibilidad de la actividad enzimática al dietilditiocarbamato quelante de cobre (Shapleigh y Payne, 1985). Se han usado también los anticuerpos policlonales y sondas de genes para determinar el tipo de nitrito reductasa presente en una bacteria desnitrificante en particular (Coyne y col., 1989; Coyne y col., 1990 y Ye y col., 1993). En la Tabla 1 se incluyen algunas bacterias desnitrificantes, de acuerdo a la nitrito reductasa que presentan. En las *Proteobacterias*, ni la nitrito reductasa con cobre ni la citocromo cd₁ se encuentran relacionadas exclusivamente con una subclase, sino que aparecen los dos tipos en cada una de las subclases alfa, beta y gama (Zumft, 1992).

1.1.2.3. Óxido nítrico reductasa

El tercer paso es la reducción de NO a N₂O catalizado por la óxido nítrico reductasa, localizada en la membrana citoplasmática (Cervantes, 2000). Ha sido aislada de *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri*. Está aparentemente formada por una subunidad de 16 kDa que contiene un grupo hemo c y otra subunidad de 53 kDa que incluye un grupo hemo b (Jetten y col.,1997). Los genes para la subunidad de 16 y 53 kDa (*norC* y *norB*) se han clonado de *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* y *P. denitrificans* (De Boer y col., 1994; Van der Oost y col.,1994; Zumft y col., 1994; Arai y col., 1995)

Tabla 1. Distribución en bacterias de los distintos tipos de nitrito reductasas

Nitrito reductasa Cd ₁	Referencia	Nitrito reductasa Con cobre	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Horio,1958; Gudat y col.,1973	<i>Achromobacter cycloclastes</i>	Iwasaki y Matsubara, 1972; Liu y col., 1986
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Lam y Nicholas, 1969; Newton 1969	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Kikutani y col., 1981
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Zumft y col., 1988	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	Abraham y col. 1993
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Iwasaki y Matsubara, 1971	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides forma sp. denitrificans</i>	Michalski y Nicholas, 1985
<i>Thiosphaera pantotropha</i>	Moir y col.,1993	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Zumft y col., 1987
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Huynh y col.,1982; Sawhney y Nicholas, 1978	<i>Nitrosomonas europea</i>	Miller y Wood, 1983
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	O'Brien y col., 1987; Yamazaki y col., 1995	<i>Bacillus holodenitrificans</i>	Denariáz y col., 1991
<i>Holomonas holodenitrificans</i>	Mancinelli y col., 1986		
<i>Pseudomonas nautica</i>	Besson y col., 1995		

1.1.2.4. Óxido nitroso reductasa

La última etapa de la desnitrificación es la reducción de N_2O a N_2 , reacción llevada a cabo por la óxido nitroso reductasa, localizada en el periplasma. Contiene ocho átomos de cobre distribuidos en dos monómeros de aproximadamente 70 kDa cada uno (Coyle y col., 1985; Andrew y col., 1994). Esta enzima es fuertemente inhibida por el oxígeno, por lo que es importante evitar su contacto para no liberar N_2O (Ferguson, 1994). Se ha descrito que ésta es la etapa más lenta de la desnitrificación.

1-1.3 . Variables que afectan la desnitrificación

Además del oxígeno, existen otras variables que pueden afectar la desnitrificación. El pH es un factor importante, ya que a valores de pH de 7 a 8 (e inclusive un poco más alcalino) la desnitrificación se efectúa eficientemente, pero a valores bajos parece haber inhibición de la N_2O reductasa por lo que hay acumulación de óxido nitroso y disminuye la eficiencia en la formación de N_2 (Prakasam y Loehr , 1972; Van Cleemput y Patrick, 1974; Delwiche y Bryan, 1976; Müller. y col., 1980;)

1.1.4. Inhibidores

Las reductasas involucradas en la desnitrificación son susceptibles a la inhibición por una variedad de compuestos, entre los que se encuentra el acetileno, pesticidas (Vapam, Dalapon) y compuestos de azufre como el SO_4^{2-} ($100-500 \mu g$ de S g^{-1}) y S^{2-} (0.3 mM). El mecanismo por el cual actúan los inhibidores no está claro, aunque

podrían afectar las distintas actividades enzimáticas. Por ejemplo, el sulfuro al parecer inhibe específicamente la reducción de NO a N₂O (Knowles, 1982).

1.2. METANOGENESIS

La metanogénesis juega un papel muy importante en el ciclo del carbono en la tierra, ya que es el paso final del flujo del carbono en muchos habitats anaerobios (como sedimentos marinos, tracto gastrointestinal, entre otros). El metano producido sirve como fuente de carbono y energía para las bacterias metanotróficas o bien puede escapar a la atmósfera.

1.2.1. Bacterias metanogénicas

Las bacterias metanogénicas pertenecen al dominio *Archaea*. Las arqueobacterias metanogénicas se distinguen de otros microorganismos porque producen metano como producto metabólico principal (Boone y Mah, 1984). El análisis filogenético de este grupo ha sido realizado en base a la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S (Balch y col., 1979; Woese, 1987). Los microorganismos metanogénicos se clasifican en cinco ordenes: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* y *Methanosarcinales* (Boone y col., 2001). De estos, solo los *Methanosarcinales* pueden óxido-reducir el acetato a CO₂ y metano y crecer utilizando como fuente de energía el metanol metiltiol o metilaminas. Se localizan en ambientes anaerobios, como es el sedimento de las aguas de los ríos, lagos y lagunas principalmente y en el tracto gastrointestinal de algunos animales. El intervalo de valores de pH en el que se desarrollan es de 6.5 a 7.8 y el intervalo de temperatura es de 30 a 40 °C para microorganismos mesofílicos y de 45 a 65 °C para los termofílicos (Balch y col., 1979).

La pared celular de estas bacterias no contiene mureína, sino pseudomureina, como peptidoglucano predominante. Sus membranas citoplasmáticas están constituidas principalmente por lípidos poliisoprenoides, en lugar de ésteres de

glicerina y ácidos grasos como ocurre en las eubacterias. La membrana celular contiene un 80% de lípidos polares y un 20% de lípidos no polares. La mayoría de los lípidos polares son fosfolípidos del tipo isoprenoide-glicerina-eter (Rivera y col., 1993)

Las bacterias metanogénicas tienen coenzimas inusuales, como las coenzimas M, F₄₂₀ y F₄₃₀ y el metanofurano (Boone y Mah, 1984). La coenzima F₄₂₀ se utiliza para la identificación de metanógenos por observación con microscopio de epifluorescencia (Doddema y col., 1978). Sin embargo, cuando los microorganismos están expuestos al oxígeno, la coenzima F₄₂₀ se degrada y ocurre la formación de los derivados F₃₉₀-A y F₃₉₀-G perdiéndose la fluorescencia característica del cofactor (Beelen y col., 1983; Dolfing y col 1985)

Las bacterias metanogénicas obtienen su energía para el crecimiento de la conversión de un número limitado de sustratos a metano. Lo mayoría utiliza el H₂ como fuente de electrones para reducir el CO₂ a metano. El formiato y el acetato también pueden ser utilizados. También se pueden utilizar compuestos con un átomo de carbono (C1), como metanol, trimetilamina y dimetilsulfuro sin descartar alcoholes como isopropanol, isobutanol o etanol (Widdel, 1986; Kiene, 1990; Thauer 1998).

Las bacterias hidrogenofílicas (consumen el H₂) obtienen su energía de la oxidación del H₂, en presencia de CO₂ como aceptor de electrones. Los ejemplos más comunes de estas bacterias son: *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* y *Methanococcus sp* (Ferry 1994).

La reducción de CO₂ a metano se realiza al parecer a través de las enzimas portadoras de compuestos de un átomo de carbono. Las tres subunidades portadoras son metanofurano (MFR), la tetrahidrometanopterina (H₄MPT) y la coenzima M, como se explica más adelante.

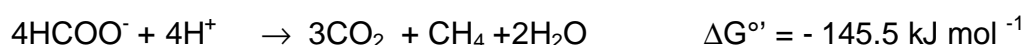
Las bacterias metanogénicas acetoclásticas producen metano a partir del grupo metilo del acetato. El 73% del metano producido por los digestores anaeróbicos viene del acetato. Sólo dos géneros realizan la metanogénesis acetoclástica, *Methanosarcina* y *Methanosaeta*. El género *Methanosarcina* tiene una baja afinidad

por el acetato y, además de éste, las bacterias pueden utilizar como fuente de energía y de carbono las metilaminas y el metanol. Las especies más representativas de este grupo son *Methanosarcina barkeri*, *M. mazei* y *M.thermophila* (Rivera y col., 1993). Las bacterias del género *Methanosaeta* (*Methanothrix*), que forman filamentos largos, no utilizan el H₂ y el formiato y no son inhibidas por estos.

1.2.2. Fisiología de la metanogénesis

En condiciones anaeróbicas todas las bacterias metanogénicas usan un grupo metilo como aceptor final de electrones, siendo la reducción de dicho grupo a CH₄ energéticamente favorable. El proceso de reducción del CO₂ a CH₄ implica el uso de ocho electrones, para lo cual estas bacterias ponen en marcha todo un complejo sistema enzimático (Rodríguez y col.,1993). Por ejemplo en la reducción del CO₂, las reacciones involucradas para la formación de metiltetrahidrometanopterina (CH₃-H₄MPT), a partir de formyl-F son catalizadas por las enzimas MF:H₄MPT formiltransferasa, metenil-H₄MPT ciclohidrolaza, metilen- H₄MPT deshidrogenasa y metilen-H₄MPT reductasa (Ferry, 1993)

Como se ha mencionado anteriormente, los microorganismos metanogénicos pueden utilizar el H₂ y CO₂, el acetato, metanol, metiltioles y/o metilaminas como fuente de energía. A continuación se muestran las energías libres de algunas de las reacciones involucradas (Thauer,1998).



El CO_2 es reducido con hidrógeno y unido al metanofurano en forma de un grupo formilo. Este grupo formilo es transferido a la tetrahidrometanopterina (H_4MPT) y reducido en forma secuencial a metenilo, metileno y metilo. El grupo metilo es posteriormente transferido a la coenzima M y finalmente reducido a metano libre. Los organismos que metabolizan el acetato transfieren el grupo metilo del acetato directamente al H_4MPT , siendo el grupo carboxilo liberado como CO_2 (Figura 2). Los organismos que crecen sobre metanol transfieren el grupo metilo (indirectamente) a la coenzima M (CoM) (Rodríguez y col., 1993). Las enzimas en la vía metanógena son muy sensibles al oxígeno, así que los metanógenos son extremadamente anaeróbicos.

El metabolismo energético de los metanógenos puede ser visto en dos partes: Una parte oxidativa, en la cual la CoM (H-S-CoM, 2-tioetanosulfonato) y la CoB (H-S-CoB, 7-tioheptanoiltreoninafosfato) son oxidados a complejo CoM-S-S-CoB; y una parte reductiva, en la cual el heterodisulfuro de coenzima M y coenzima B son reducidos.

1.2.2.1. Parte oxidativa

En esta etapa, la metil-CoM es el intermediario central. La metil-CoM se forma a partir de la CoM y el acetato, CO_2 o compuestos reducidos de un átomo de carbono tales como el metanol, metiltioles y metilaminas (Figura 2). La metil-CoM se reduce posteriormente con la CoB a metano con la formación de un heterodisulfuro de coenzima M y coenzima B (Bobik y col., 1987; Ellerman y col., 1988).



Esta reacción es exergónica y es catalizada por metil-CoM-reductasa, la cual es irreversible y no está acoplada a la conservación de energía (Thauer y col., 1993). La CoM y la metil-CoM se han encontrado hasta ahora sólo en bacterias

metanogénicas (Balch y Wolfe, 1979). Las otras enzimas y coenzimas involucradas en la metanogénesis, con excepción de la coenzima B, también se han encontrado en arqueobacterias sulfato reductoras (Vorholt y col., 1995, 1997; Klenk y col., 1997).

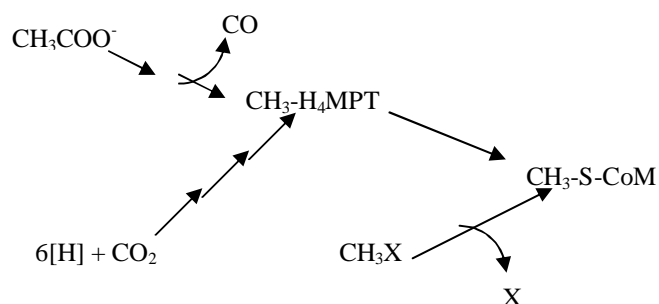


Fig 2. Vías para la formación de metil-CoM a partir de acetato, CO_2 y Compuestos reducidos de un átomo de carbono (CH_3X), como metanol y metilaminas.

En la metanogénesis a partir del CO_2 y el acetato, la N^5 -metiltetrahidrometanopterinina ($\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT}$) o N^5 -metiltetrahidrosarcinapterina ($\text{CH}_3\text{-H}_4\text{SPT}$), respectivamente, son intermediarios en la formación de la metil-CoM (Escalante y col., 1984; Fisher y Thauer 1989). La H_4MPT está presente sólo en los Methanobacteriales, en otros ordenes aparecen otras formas modificadas de la H_4MPT , tetrahidrosarsinapterina (H_4SPT) en Methanosarcinales y Methanococcales y la tatiopterina y/o termopterina en Methanomicrobiales (Gorris y van der Drift, 1994). El grupo metilo de la $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT}$ es transferido a la CoM en una reacción exergónica ($\Delta G^\circ = -30 \text{ kJ mol}^{-1}$), acoplada con la conservación de energía vía un potencial electroquímico de sodio generado en la membrana citoplasmática (Thauer, 1998).

1.2.2.2. Parte reductiva

Desde la generación del heterodisulfuro en la parte oxidativa la energía requerida para el metabolismo no está aparentemente acoplada a la formación neta de ATP. El crecimiento de los metanógenos, sin embargo, es posible. La energía requerida puede generarse debido a que la reducción exergónica del heterodisulfuro está acoplada con la fosforilación del ADP (Peinemann y col., 1990; Deppenmeier y col., 1990,1991; Sparling y col., 1993). En condiciones estándar, el cambio de energía libre asociado a la reducción del heterodisulfuro con H₂ es - 40 kJ mol⁻¹, con formiato es - 43.5 kJ mol⁻¹, con metanol es -34 kJ mol⁻¹, con lo cual es suficiente para la fosforilación de 1 mol de ADP ($\Delta G^\circ = + 31.8 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Thauer y col., 1977). Los cambios de energía libre tan pequeños indicarían que la biomasa que puede formarse será necesariamente muy escasa.

1.2.2.3. Reducción heterodisulfuro con H₂

La reducción del heterodisulfuro involucra la participación de dos enzimas, una deshidrogenasa y una heterodisulfuro reductasa, y una cadena de transporte de electrones que conectan las dos enzimas.



1.2.3. Inhibidores

Hay una gran variedad de sustancias químicas que pueden bloquear fisiológicamente la formación de metano. El oxígeno a muy bajas concentraciones puede inhibir el crecimiento de los microorganismos metanogénicos. Los óxidos de nitrógeno, nitrato, nitrito, óxido nitroso y óxido nítrico inhiben la metanogénesis

(Balderson y col.,1976). El ácido 2- bromoetanosulfónico (BES) actúa como inhibidor debido a que tiene una estructura análoga a la coenzima M. Los metanos clorados (cloroformo, cloruro de metileno, etc) son inhibidores competitivos de la formación de metano. El acetileno y el etileno también inhiben la formación de metano.

1.3. INTERACCIONES

En la naturaleza raramente un microorganismo permanece aislado, normalmente aparece formando grupos (población). Esta población coexiste con otras presentes en el hábitat y se dice que interactúan unas con otras, para formar una comunidad microbiana. Se piensa que cada miembro de la comunidad contribuye al mantenimiento de la misma, aunque la forma en que esto se lleva a cabo no se conoce bien. Por ejemplo, en un proceso desnitrificante que se mantiene durante meses, la población aparentemente activa es desnitrificante, pero, ¿que ocurre con los demás integrantes de la comunidad (lodo)? ¿de qué forma contribuyen al mantenimiento de la misma o en el proceso? Algunas hipótesis han tratado de explicar estas interacciones, aunque suelen quedarse a nivel especulativo. Las evidencias no son aún claras, no obstante tienen cierta lógica.

Se dice que dentro de las comunidades pueden ocurrir interacciones positivas y negativas. Una interacción positiva es cuando uno o ambos miembros se benefician, sin perjudicarse (comensalismo, sinergismo y mutualismo) y una interacción negativa es cuando uno o ambos miembros son afectados negativamente (competencia y amensalismo).

En el comensalismo una población se beneficia cuando la otra no es afectada. (la metanogénesis, por ejemplo, puede resultar de una relación comensal). El mutualismo es una relación obligada entre dos poblaciones que se benefician mutuamente, requiriendo una estrecha proximidad física. En el sinergismo ambas poblaciones se benefician de la relación. Se piensa que la transformación completa de la materia orgánica a CH_4 y CO_2 en condiciones anaeróbicas, involucra interacciones complejas de varios grupos de bacterias, (Schmidt y Ahring, 1995).

Estas interacciones incluyen el comensalismo y sinergismo. En el primer paso del proceso las bacterias fermentativas hidrolizan los polímeros biológicos (como celulosa, pectina, etc), por medio de enzimas extracelulares, y son formados oligómeros y monómeros(como, acetato y otros ácidos grasos volátiles de cadena corta, propionato y butirato, además de H_2 y CO_2). En condiciones metanogénicas, los ácidos grasos de cadena corta diferentes al acetato son oxidados a acetato y H_2/CO_2 por bacterias acetogénicas productoras obligadas de H_2 (OHPA). Finalmente, el acetato es convertido a metano por bacterias metanogénicas (Schmidt y Ahring, 1996). Un grupo menos numeroso es el de las bacterias acetogénicas consumidoras de H_2 que reducen el CO_2 , CO , CH_3OH y grupos metoxilo de los compuestos aromáticos para formar acetato y, en algún caso butirato. Las bacterias capaces de realizar la carboxilación reductiva de propionato a butirato pueden ser otro grupo que se encuentra en proporción menor (Tholozan y col., 1988). Esta argumentación, como puede verse, tiene un enfoque microbiológico, basado en las capacidades de los distintos grupos. Sin embargo, suelen observarse algunas inconsistencias cuando se hacen sus análisis cinéticos: las bacterias metanogénicas tienen un metabolismo lento y crecen escasamente en comparación con los otros grupos del sistema, por lo que en el proceso metanogénico debería haber una acumulación de acetato, pero experimentalmente esto no ocurre.

La competencia es una interacción negativa entre dos poblaciones, en la cual ambas están siendo afectadas de forma adversa. Un ejemplo de esta interacción es la que se da entre bacterias metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras (BSR) cuando compiten entre ellas por los donadores de electrones. También se puede presentar el amensalismo (cuando una población microbiana produce una sustancia que es inhibitoria a otras poblaciones) cuando se produce una inhibición de la actividad bacteriana por especies de sulfuro (Maillacheruvu y Parkin, 1996). Hay varios mecanismos que han sido propuestos para explicar esta compleja interacción. Choi y Rim (1991) informaron que las bacterias metanogénicas y BSR entran en competencia con una proporción COD/S de 1.7–2.4. Estos autores, también

reportaron, que niveles de 160-200 mg sulfuro /L y 120-140mg sulfuro/L resultaron inhibitorios a las BSR y metanogénicas respectivamente.

1.4. RECOMBINACION GENETICA

La recombinación genética podría ser otra forma de explicar cómo una población bacteriana se adapta o sobrevive a cambios en el ambiente. En los procariontes se da recombinación cuando en una célula receptora hay inserción de fragmentos de ADN genéticamente diferente procedente de una célula donadora. Puede llevarse a cabo a través de diferentes procesos: transformación, transducción y conjugación. La transferencia horizontal de genes es probablemente la principal fuente que conduce a cambios en los caracteres ecológicos de las células bacterianas (de la Cruz y col., 2000).

La transformación es un proceso en el cual el ADN libre es insertado directamente en una célula receptora competente. Dicho proceso ha sido ampliamente estudiado en *Pseudomonas stutzeri* debido a su gran versatilidad fisiológica y ecológica (Sikorski y col., 2002), y a que bacterias de esta especie están involucradas en diversos procesos como nitrificación y desnitrificación (Zumft, 1997). El potencial para la transformación genética natural fue encontrado sólo en unas pocas cepas de *P. stutzeri* las cuales fueron en su mayor parte aislados clínicos (Carlson y col., 1983; Lorenz y col., 2000).

La transducción implica la transferencia de ADN bacteriano de una bacteria a otra dentro de un virus temperado, o de una partícula viral defectuosa.

Por último, la conjugación es un proceso de transferencia genética que supone un contacto real entre una célula donadora y otra receptora. La conjugación ha sido estudiada en líquidos y en poblaciones bacterianas naturales organizadas en comunidades llamadas biopelículas (Costerton y col., 1995), encontrándose altas tasas de conjugación en biopelículas bacterianas (Hausner y col., 1999).

1.5. SEGUIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS

En los reactores anaerobios utilizados en los tratamientos de aguas residuales existe una gran cantidad de grupos de microorganismos que eliminan la materia orgánica. Sin embargo, se dispone de poca información acerca de su composición y la biología de estos sistemas, ya que durante muchos años fueron vistos como “cajas negras”. Actualmente están disponibles muchas técnicas microbianas que permiten estudiar la composición del sistema y seguir los cambios en la población (Elferink y col, 1998). A continuación se muestran algunos de los métodos que pueden ser aplicados en bioreactores.

1.5.1. Numero más probable (NMP)

Es un método de cuantificación microbiana clásico, basado en el crecimiento sobre un medio selectivo. Es una técnica en la cual se realizan una serie de diluciones que son inoculadas en un medio selectivo líquido. Este método puede dar información muy importante del número de microorganismos que son capaces de crecer sobre un medio artificial. Sin embargo, hay que tener en mente que el NMP puede sobreestimar el número de microorganismos si están unidos a sustratos sólidos, o si están asociados entre sí, como la bacteria acetoclástica *Methanosaeta sp* (Grotenhuis y col., 1991; Whitman y col., 1992). Otros microorganismos que probablemente pueden ser sobreestimados con el método NMP son las bacterias que crecen en consorcios sintróficos, como degradadores de propionato o butirato-acetogénos (Elferink y col., 1998). Una limitación adicional que presenta esta técnica es que sólo alrededor del 1 al 15 % de las bacterias pueden ser cultivadas (Atlas y Bartha, 2002). La fracción que no puede ser cultivada se denomina fracción viable no cultivable y se ha postulado que el no crecimiento podría ser una

estrategia de supervivencia desarrollada por las bacterias cuando se encuentran en condiciones ambientales adversas (*Lleó y col.*, 1999).

1.5.2. Técnicas inmunológicas

Se basan en la obtención y el uso de anticuerpos frente a antígenos. Se incuban las bacterias con dichos anticuerpos y se determina si existe unión antígeno- anticuerpo. El criterio para considerar una respuesta inmunológica positiva es el reconocimiento de una proteína de aproximadamente el mismo tamaño molecular que el de un control conocido. Se han utilizado anticuerpos policlonales para identificar el tipo de nitrito reductasa presente en bacterias desnitrificantes (Coyne y col., 1989).

1.5.3. Técnicas Moleculares

En la década pasada se desarrollaron nuevos métodos que han permitido la identificación directa de microorganismos en las poblaciones, usando los ácidos nucleicos (ADN o ARN) de los mismos. Estos métodos han sido desarrollados para detectar y cuantificar distintos grupos filogenéticos, tomando como base tanto el ADN ribosomal, así como otros genes estructurales (Schneegurt y Kulpa, 1998).

1.5.3.1. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos

Es una forma de detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos o genes de interés, a través de la hibridación (unión) de una sonda de ADN o ARN con los ácidos nucleicos extraídos de muestras ambientales. El ADN o ARN extraído de la muestra de interés (suelo, agua, lodo, etc), previamente digerido, es fijado a una membrana cargada positivamente (nitrocelulosa o nylon). Se utiliza una sonda que puede ser marcada con ^{32}P o con compuestos quimioluminiscentes para identificar un gen o fragmento de ADN. Cuando se utiliza ADN se denomina transferencia

“Southern blottins” y cuando es ARNm o ARNr se denomina “Northern blotting” (Schneegurt y Kulpa, 1998).

1.5.3.2. Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) y técnicas derivadas.

Se han desarrollado algunos métodos para cuantificar y ordenar filogenéticamente organismos por medio de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Ferré y col., 1994). El propósito de esta técnica es conseguir un gran número de copias (amplificación) de un gen o fragmento deseado, basándose en el sistema de replicación natural del ADN en la bacteria. Se utiliza una ADN polimerasa termoestable, obtenida de *Thermus aquaticus* (Taq) para amplificar el ADN de las secuencias de interés. Asimismo, se diseñan unos cebadores o “primers”, que son secuencias de oligonucleótidos sintéticos que permiten delimitar la región del ADN blanco que se desea amplificar, al ser sus secuencias conocidas y complementarias con el gen o fragmento que se quiere amplificar (Sambrook y col., 2001). El primer paso del proceso consiste en desnaturalizar la doble hélice de ADN, a continuación los cebadores son hibridados y después se propicia el proceso de elongación de la cadena de ADN. Este ciclo básico se repite alrededor de 30-40 veces generando una gran cantidad de copias del fragmento de interés.

Es una técnica excelente para examinar comunidades mixtas. Sin embargo, la menor contaminación puede llegar a dar falsas amplificaciones positivas y negativas (Wilson, 1997). Las reacciones de PCR no son cuantitativas y la cantidad de un género determinado en la muestra puede afectar los resultados a través de la competencia (Suzuki y Giovannoni, 1996). Cuando una función es llevada a cabo por varios grupos filogenéticos, como es el caso de la desnitrificación, los cebadores diseñados para la detección molecular suelen ser más degenerados, lo que incrementa el riesgo de alineamiento inespecífico de los cebadores con secuencias no-blanco. En el caso de la desnitrificación, se han diseñado diferentes cebadores

para identificar bacterias desnitrificantes en muestras ambientales (Braker y *col.*, 1998; Halling y Lingrend, 1999; Michotey y *col.*, 2000).

Hay muchas variaciones de la técnica básica de PCR. Una de ellas llamado PCR competitivo (PCRc), aporta carácter cuantitativo a la técnica, mediante el uso de un estándar interno en la amplificación del ADN blanco. Usualmente el estándar interno difiere sólo ligeramente de la molécula blanco (por ejemplo, se puede construir una molécula que tenga el mismo inicio y final que el fragmento de interés, pero que difiera en tamaño). De esta manera se puede diferenciar de la molécula blanco y, al mismo tiempo competir por los cebadores en la PCR. Ambos, el estándar interno y la molécula blanco son amplificados y la proporción entre las señales obtenidas de ambos productos suministran información cuantitativa sobre la cantidad de ADN blanco originalmente presente en la muestra (Ferré y *col.*, 1994). En un estudio previo, se ha cuantificado el citocromo *cd1* (*nirS*) de muestras de sedimentos y agua de mar, mediante PCRc y NMP-PCR (Michotey y *col.*, 2000). En la técnica de NMP-PCR el ADN es diluido serialmente antes de la amplificación por PCR, y la cuantificación se realiza de acuerdo al número de amplificaciones positivas por dilución y el número mínimo de blancos que puede ser amplificado con los cebadores (Schneergurt y Kulpa, 1998; Michotey y *col.*, 2000)

La PCR asociada con transcriptasa reversa (RT-PCR) es otra técnica derivada de la PCR. Antes de la amplificación por PCR, el ADN de la muestra es destruido con ADNasas. La transcriptasa reversa y los cebadores son adicionados a la mezcla de reacción y el ARN de la muestra (tanto ARNm como ARNr), son susceptibles de ser convertidos en ADN. El PCR es usado entonces, para amplificar secuencias específicas de interés (Schneergurt y Kulpa, 1998). La RT-PCR les da a los investigadores la capacidad para detectar y cuantificar la expresión de genes individuales. En un estudio reciente se detectó y estudió la diversidad de expresión de diversos genes implicados en el proceso desnitrificante, en concreto los que codifican para dos nitrato reductasas (*narG* y *napA*), dos nitrito reductasas (*nirS* y *nirK*) y una óxido nitroso reductasa (*nosZ*), encontrándose presentes los cinco genes

en los dos sedimentos analizados, pero sólo la expresión activa de los genes *nirS* y *nosZ* en ese tiempo de muestreo (Nogales y col., 2002).

1.5.3.3. Procedimientos basados en el polimorfismo

La separación o detección de pequeñas diferencias en secuencias específicas del ADN puede dar información importante acerca de la estructura de la comunidad y la diversidad de microorganismos que contienen un gen crítico. Generalmente estas técnicas están acopladas a la reacción de PCR y los productos de PCR amplificados pueden ser examinados empleando técnicas capaces de detectar sustituciones sencillas en las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, en genes de tamaños similares se pueden encontrar diferencias, haciendo un análisis de restricción con endonucleasas de los productos amplificados (Schneergurt y Kulpa., 1998).

Otro método de éste tipo es el del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). A diferencia de la técnica convencional de la PCR, se usa solo un cebador más corto e inespecífico, dando como resultado un patrón de bandas similar a una huella digital (Williams y col., 1990) Este método tiene la ventaja de que no se requiere conocer el genoma y de que genomas distintos dan patrones de amplificación diferentes. Es una técnica útil incluso cuando se requiere hacer una diferenciación por debajo del nivel de subespecie. Sin embargo, los patrones de bandas no son siempre reproducibles debido a que es un método sensible a pequeñas variaciones en la concentración y pureza del ADN blanco, en la concentración del Mg^{+2} y en la temperatura (Davin y col., 1995; Skroch y col., 1995; Erlandson y Batt, 1997). Los análisis por RAPD han sido usados para investigar la diversidad microbiana en una variedad de biorreactores con poblaciones microbianas mezcladas (Breen y col., 1995).

La técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) permite separar los productos de PCR con una precisión tal que puede detectarse la sustitución de una sola base (Myers y col., 1987; Muyzer y col., 1993). Las muestras

se aplican en este caso, en un gel vertical de poliacrilamida en el que se establece un gradiente desnaturalizante (formamida y/o urea).

Como se puede observar, los avances en las técnicas de biología molecular pueden proporcionar herramientas para seguir la estructura de una comunidad, así como caracterizar y cuantificar microorganismos en muestras ambientales y en reactores biológicos. Estas técnicas podrían permitir comprender mejor, y tal vez optimizar, algunos procesos biológicos.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Estabilización del lodo desnitrificante

Se utilizó un reactor de mezcla completa, con un volumen de trabajo de 1.3 L. Para el control del flujo de alimentación, salida y ácido se utilizaron bombas peristálticas (Figura 3). El sistema incluyó un controlador de pH y temperatura, así como una columna receptora de gas. Se mantuvo en agitación a 150 rpm. La velocidad de carga del medio fue de 700 mg C-acetato /L. d y 500 mg N-NO₃⁻/L. d, la C/N fue de 1.4. El tiempo de residencia hidráulico (TRH) fue de 2 días.

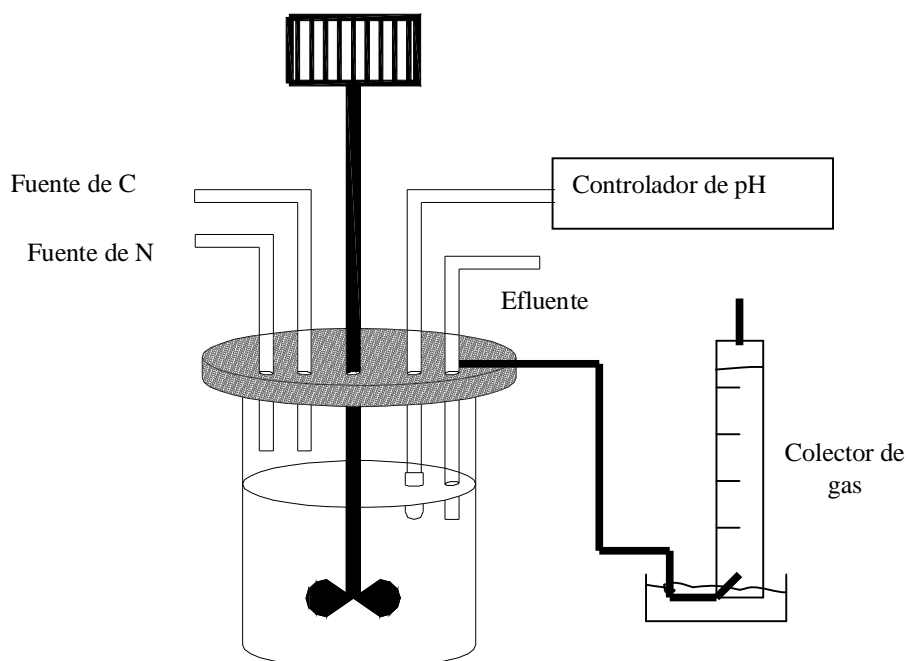


Figura 3. Sistema de biorreacción: La fuente reductora fue acetato de sodio y la oxidante fue nitrato de sodio. La temperatura se mantuvo a 30° C y un pH de 7.

El lodo utilizado provino de la planta de agua residual de la UAM- Iztapalapa, previamente se lavo dos veces con una solución isotónica de cloruro de sodio

(0.9%). La concentración de la biomasa medida en sólidos suspendidos volátiles (SSV) fue de 15.57 g SSV / L y se inoculo al 10%.

Medio de cultivo: Se utilizaron dos medios de cultivo, el primero con la fuente de electrones y el segundo con el aceptor de electrones (NO_3^-). Se adicionaron por separado al reactor para evitar precipitados. La composición de los medios utilizados se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Medio de cultivo para el reactor en el proceso desnitrificante

Medio 1	g/L	Medio 2	g/L
KH_2PO_4	0.3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.017
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.06	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.075
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.15	NaNO_3	12.14
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	16.1		

4.2. Aislamiento de bacterias desnitrificantes

Para el aislamiento se utilizaron botellas de 58 ml, con un volumen de 22.5 mL de medio A (Tabla 3), el medio utilizado fue idéntico cualitativamente al medio del reactor. Se inoculó al 10 %, con lodo desnitrificante previamente estabilizado en régimen estacionario. El reactor en estas condiciones tenía una concentración de SSV de 2.93 g/L. Dichas botellas se incubaron a 30°C.

Se hicieron tres resiembras sucesivas, en el mismo medio A hasta obtener una población microbiana más uniforme (vista al microscopio). A cada botella se le midió la concentración de nitrato y la formación de N_2 . De la última inoculación se hizo siembra en placa y se tomaron las bacterias de morfología colonial distinta. Las colonias aisladas se sembraron primero en tubos y luego en botellas utilizando el

medio B (Tabla 3).. También se les midió la concentración de nitrato y formación de N_2 .

Tabla 3. Medio de aislamiento para microorganismos desnitrificantes

Medio A	g/L	Medio B	g/L
KH_2PO_4	0.15	KH_2PO_4	0.075
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.005	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0025
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.015
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0075	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.00375
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	8.05	$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	4.06
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0085	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.00425
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0025	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.00125
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0375	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.018775
$NaNO_3$	6.07	$NaNO_3$	3.035
		Agar*	16

* Solo para medio sólido

4.3. Estabilización del proceso metanogénico

Se utilizó el mismo reactor que se describe en la Figura 3, con el mismo volumen de trabajo (1.3 L) y las mismas condiciones de operación. La velocidad de carga fue de 700 mg C-acetato /L d y 23.3 mg N- $(NH_4)_2SO_4$ / L d. La relación C/N = 30 y el tiempo de residencia hidráulico (TRH) de dos días.

Medio de cultivo: Se utilizaron dos medios de cultivo, el primero con la fuente de carbono y el segundo con la fuente de nitrógeno, adicionándose por separado al reactor para evitar precipitaciones. La composición de los medios utilizados se

muestra en la Tabla 4. Se puede apreciar que para este caso la fuente de nitrógeno utilizada fue una sal de amonio.

Tabla 4. Medio de cultivo del reactor metanogénico

Medio 1	g/L	Medio 2	g/L
KH ₂ PO ₄	0.3	FeCl ₃ .6H ₂ O	0.017
CH ₃ COONa.3H ₂ O	16.1	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.05
Sol 0.18g / L NiCl ₂ .6H ₂ O	1 ml	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.075
		(NH ₄) ₂ SO ₄	0.44
		Sol. 0.916 g/ L CoCl ₂ .6H ₂ O	1 ml

4.4. Métodos analíticos para el seguimiento del reactor

4.4.1. Compuestos nitrogenados

4.4.1.1. Cuantificación de amonio

El método empleado fue el del electrodo selectivo ión de amonio. Se le adicionó NaOH a la muestra para convertir el ión amonio a amoniaco. El amoniaco pasa a través de una membrana permeable al gas, la cual es colocada en el fondo del electrodo selectivo de ión, modificando el pH de la solución interna. El cambio es detectado por un electrodo interno de pH. La lectura del potencial es en mV y se realizó con un potenciómetro Cole-Parmer (DigiSense), bajo agitación constante, a temperatura ambiente.

La concentración de amoniaco fue determinada mediante una curva de calibración construida a partir de una solución estándar de NH₄Cl. De forma cotidiana, fue

preparada la curva estándar de nitrógeno amoniacal usando concentraciones conocidas de 500 ppm, 100ppm y 50 ppm de N-NH₄. La Figura 4 presenta los valores obtenidos al construir la curva estándar. El valor obtenido es proporcional al logaritmo de la concentración, cuyo valor puede ser determinado directamente de la gráfica o de la ecuación de la recta, ajustada por el método de mínimos cuadrados.

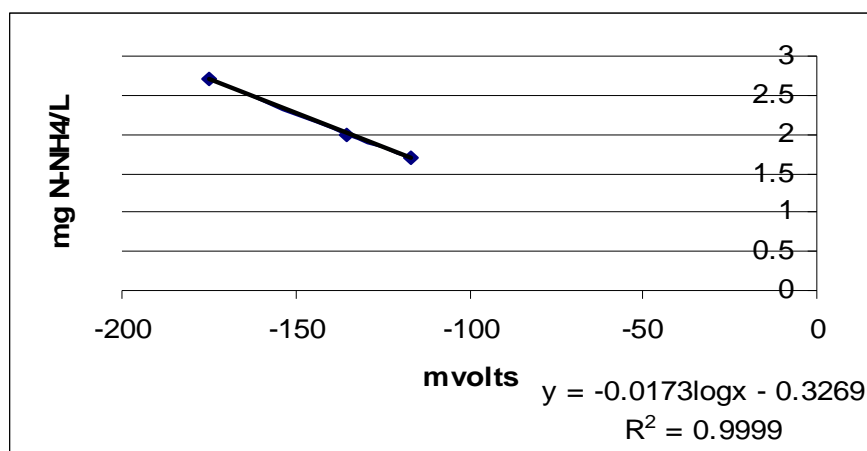


Figura 4. Curva estándar con concentraciones conocidas de nitrógeno de amonio

Procedimiento. Este protocolo se aplicó tanto para las muestras como para los estándares. A 50 ml de muestra se le adicionó 0.5 mL de NaOH 10N. Con las soluciones estándar se corroboró la calibración del equipo y se construyó la curva de calibración. Las muestras se midieron inmediatamente después de prepararse. La lectura se tomó después de tres minutos de agitación constante, cuando la lectura en mV fue estable. La concentración de nitrógeno de las muestras se calculó por interpolación con la ecuación de la curva de calibración.

4.4.1.2. Cuantificación de nitrato (NO₃⁻) y nitrito (NO₂⁻)

El método utilizado fue electroforesis capilar de iones. El método se basa en la migración electroforética de iones al aplicar un voltaje a través de un capilar,

causando una migración diferencial de los componentes de la muestra cargada eléctricamente hacia el electrodo positivo. Dependiendo de la polaridad de la energía suministrada y la composición del electrolito, el ión separado pasa a través de un detector.

Se utilizó un analizador capilar de iones (CIA 4000, MilliporeTM), a temperatura ambiente. Como capilar se empleó una columna de sílice fundida, de 60cm de largo y 75 μm de diámetro interno, con una corriente de 18 μA y un suministro de energía negativo con un voltaje de 20 KV. La absorbancia se midió en la región ultravioleta con lámpara de mercurio a 254 nm.

Solución de electrolito: 4.6 mL de cromato de sodio 4.6 mM + 2.3 mL de solución CIA-PAC OFM Anion-BT, se afora a un volumen de 100 mL con agua destilada. Se filtra la solución con una membrana de 0.45 micras.

La cuantificación de nitrito y nitrato, se hace con base a un estándar de referencia, una solución de concentración conocida de nitrato y nitrito, 25 ppm de N-NO_3^- y 25 ppm N-NO_2^- .

Preparación de muestras: Las muestras se centrifugan a 12000 rpm por 10 min., se filtra con una membrana de 0.45 micrómetros. El filtrado es colocado en un tubo Eppendorf, evitando la formación de burbujas.

4.4.1.3. Nitrógeno y óxido nitroso.

Cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3350, con un detector de conductividad térmica y un integrador Shimadzu CR501 Chromatopac. La fase móvil fue helio, y las condiciones de operación: columna, 35°C; inyector 100 °C; detector, 110°C; filamentos 135°C y un volumen de inyección de 0.1 mL de

muestra. Se tomó periódicamente muestra del gas producido en el reactor a través del sistema de recolección de gas.

Para medir el N_2 en el cultivo en lote se construyó una curva estándar de nmoles vs. áreas (Fig. 5), basada en la ecuación de los gases ideales:

$$n = PV/RT, \text{ donde:}$$

V = volumen de gas inyectado

P= presión atmosférica

R= constante de los gases ideales

T=temperatura

n= número de moles

$n = w / PM$

w= peso (g), PM = peso molecular g/mol

Se preparan una serie de botellas que contienen 25 mL de medio y un volumen de fase gaseosa conocido. Se purgan con helio y a continuación se inyecta a cada botella una cantidad de N_2 conocida (5, 10 mL, etc.), Después se realiza la medición de nitrógeno molecular en el cromatógrafo de gases mencionado anteriormente y se anotan las áreas. Por último se construye una curva estándar que sirve para interpolar muestras de interés.

V = 30.545 L a 30°C y 0.8 atm

$$\frac{\text{mL gas inyectado}}{\text{Vol. Fase vacía}} \left| \frac{1 \text{ mol gas}}{30.545 \text{ L}} \right. \longrightarrow \text{mol/L} \longrightarrow \text{g/L}$$

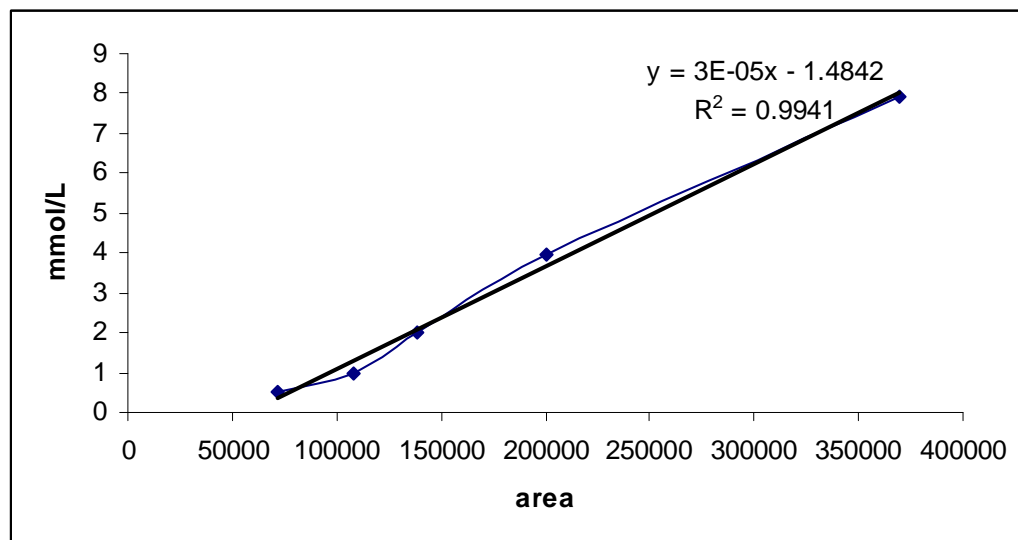


Fig. 5. Curva estándar de N_2 vs. área del cromatógrafo, para pruebas en lote

4.4.2. Carbono Orgánico

Se utilizó un analizador de carbono orgánico total modelo TOC-5000 de ShimadzuTM. Este equipo cuenta con un tubo de combustión para carbón total que contiene catalizador de la combustión y es calentado a 680°C. Como gas de arrastre utiliza aire de alta pureza. La muestra se introduce mediante un inyector al tubo de combustión en donde los componentes del carbono total se descomponen. Los productos de la combustión pasan por un analizador de gas infrarrojo, en donde es detectado el CO_2 , cuya área es calculada por un procesador de datos. El área es proporcional a la cantidad de carbono en la muestra

Para medir carbono orgánico, la muestra es acidificada (0.3 mL de HCL 3N para un volumen de 5mL) y se somete a burbujeo durante tres minutos, para que el carbonato y bicarbonato se eliminen en forma de CO_2 .

4.4.3. Biogás

La medición de metano se realizó en el reactor de la misma forma descrita para el nitrógeno y óxido nítrico, bajo las mismas condiciones y utilizando el mismo equipo.

Para medir el metano producido en los tubos utilizados para obtener el número más probable de microorganismo metanogénicos, se utilizó un cromatógrafo de gases (Gow-Mac Instrument CO.), con un detector de conductividad térmica. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes: Columna, 140°C; detector, 190°C; Inyector, 170 °C; corriente de los filamentos 120 mA; gas acarreador, helio; presión, 40 psi; Empaque de columna. Carboxen, 80/100.

4.5. Método microbiológico

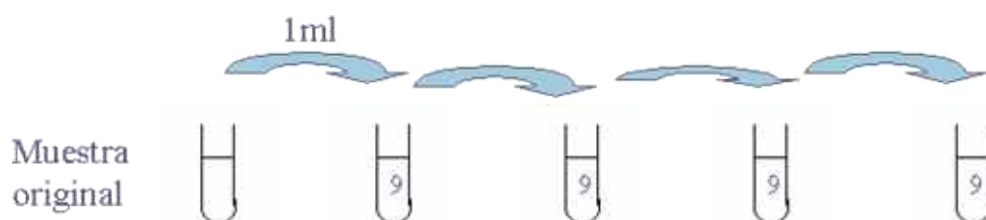
4.5.1. Número más probable

Se prepararon dos medios de cultivo para determinar el número más probable de microorganismos desnitrificantes y metanogénicos. El medio utilizado para los desnitrificantes fue el medio B descrito anteriormente en la Tabla 3. El medio utilizado para las bacterias metanogénicas fue el propuesto por Balch y Wolfe (1979) y se muestra en la tabla 5. La cuantificación se realizó en ambos procesos en el estado estacionario.

A cada tubo se adicionó 4.5 mL del medio correspondiente, se inocularon al 10% (V/V). La primera dilución (10^{-1}) se inoculó con 0.5 mL de lodo y se hicieron diluciones sucesivas hasta 10^{-10} , realizándose cuatro replicas (Figura 6). Los tubos con el medio desnitrificante se incubaron a 30 °C por un periodo de dos semanas y los que contenían el medio metanogénico a 36°C por un periodo de 1 mes.

Tabla 5. - Medio para el aislamiento de microorganismos metanogénicos

Solución	Volumen	g/L
Mineral 1	50 mL	K_2HPO_4 6
Mineral 2	50 mL	KH_2PO_4 6; NaCl 12; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.1; $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.16
Oligoelementos	10 mL	Ácido nitroacético 1.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.0, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.5; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1; $ZnSO_4$ 0.1; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01; $AlK(SO_4)_2$ 0.01; H_3BO_3 0.01; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.01
Vitaminas	10 mL	Biotina 0.002, ácido fólico 0.002; piridoxina 0.01; tiamina 0.0005; riboflavina 0.005; ácido p-aminobenzóico 0.005.; ácido lipóico 0.005
Cloruro de níquel	1 mL	$NiCl_2$ 0.05
Sulfato de hierro	1 mL	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2
Compuesto		
Extracto de Levadura		1
Peptona de caseína		1
Resazurina	1 mL /L	
Cisteína		0.5

**Figura 6.** Número más probable. Se realizan diluciones sucesivas por triplicado o cuadruplicado

Después de la incubación, a los tubos desnitrificantes y metanogénicos se les midió la producción de N₂ y metano, respectivamente, por cromatografía de gases. Se anotaron los tubos positivos y negativos por dilución y se consultó las tablas de Cochran (1950) para conocer el NMP. La siguiente fórmula se aplicó para conocer el número de bacterias/mL

$$\text{No de bacterias / mL} = (\text{NMP} \times \text{Dilución}) / \text{vol. de inóculo}$$

4.6. Métodos moleculares

4.6.1. Extracción de ADN del lodo

Se probaron tres métodos, denominados como a, b y c

Método a: Se basa en el desarrollado por Sekiguchi y col (1998), con algunas modificaciones (Mendoza, 2004). Se toman 1.5 mL de lodo del reactor y se centrifugan a 14000 rpm durante 5 min. Se recupera la pastilla, se le adiciona 1 mL de amortiguador de fosfatos 10 mM y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min. Se resuspende la pastilla en 0.5 mL de un amortiguador TEN (ver Anexo A) y se macera con hielo seco y etanol (previamente se lava el mortero y el pistilo y se tapa para meterse al ultra congelador a -70 °C, por lo menos dos horas antes de utilizarlo). El polvo obtenido se resuspende en 2 mL de TEN (ver Anexo A), se le agregan 2 mg/mL de proteinasa K y se digiere a 37° C durante 40 min. Después se agregan 30 µl de SDS, al 30% (peso/volumen), por cada mL de suspensión de lodo. Se congela con hielo seco y etanol 40 seg. y se descongela a 65°C durante cinco minutos. Este paso de congelación y descongelación se realiza tres veces. A continuación se adiciona un volumen igual de fenol neutro (ver anexo A), agitando suavemente y formando arcos, se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min. y se recupera la fase acuosa en otro tubo. Se repite este paso cuatro veces

(hasta que la interfase esté limpia). Se adiciona un volumen igual de fenol-CIA (1:1) y se centrifuga a 14000 rpm durante cinco minutos. Se recupera la fase acuosa, se adicionan 2.5 vol. de alcohol etílico absoluto y 0.25 vol. de acetato de sodio 3M, pH 7.0, dejándose precipitar durante un mínimo de 2 horas a -20°C . Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 14000 rpm durante 20 min. a 4°C . Se recupera la pastilla, se lava con etanol al 70% (v/v) y se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min. Finalmente se deja secar a temperatura ambiente hasta que se evapore el alcohol, se agregan 50 μl de amortiguador TE (ver Anexo A) y se deja resuspender por lo menos una hora. La eliminación del ARN se consigue añadiendo 2.5 μl de ARNasa (1mg/mL) e incubando a 37°C durante 30 min. Los ácidos nucleicos se precipitan con 2.5 vol. de etanol absoluto y 0.25 vol. de acetato de sodio 3M, pH 7.0, dejándose reposar un mínimo de 2 horas a -20°C . Tras ese tiempo se centrifugan a 14000 rpm a 4°C durante 20 min. recuperándose la pastilla y lavándola con etanol al 70%. Se centrifuga 5 min. a 14000 rpm y finalmente se adicionan 50 μl de amortiguador TE y se deja resuspender por lo menos 1 hora.

Método b: Se toman 1.5 mL del lodo y se centrifugan a 14000 rpm durante 5 min. Se recupera la pastilla celular y se le adiciona 1 mL de amortiguador de fosfatos + 800 μl de fenol neutro + 500 mg de perlas de zirconio. Las células son fragmentadas con ayuda de un macerador (Bead-beater) a 5000 rpm durante 2 min. Posteriormente se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min., se toma la fase acuosa y se transfiere a otro tubo. Se agregan 2 mg/mL de proteinasa K, se digiere a 37°C durante 40 min y se adiciona un volumen igual de fenol neutro (ver Anexo A), agitando suavemente y formando arcos. Se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min y se recupera la fase acuosa en otro tubo. Se repite este paso cuatro veces y se añade, a continuación un volumen igual de fenol-CIA (1:1), centrifugándose a 14000 rpm durante cinco minutos. Se recupera la fase acuosa y se le adiciona 2.5 vol. de alcohol etílico absoluto y 0.25 vol. de acetato de sodio 3M, pH 7.0, dejándose un mínimo de 2 horas a -20°C . Transcurrido ese tiempo,

se centrifuga a 14000 rpm durante 20 minutos. a 4°C, se recupera la pastilla y se lava con etanol al 70%, centrifugándose a 14000 rpm durante 5 minutos. Se deja secar hasta que se evapore el alcohol y se agregan 50 µl de amortiguador TE, dejándose resuspender por lo menos durante una hora. Se agregan 2.5 µl de ARNasa (1mg/mL) y se incuba la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Se precipitan los ácidos nucleicos con 2.5 vol. de etanol absoluto y 0.25 vol. de acetato de sodio 3M, pH 7.0 y se deja reposar un mínimo de 2 horas a -20°C. Transcurrido este periodo, se centrifuga a 14000 rpm y 4°C durante 20 minutos. Se recupera la pastilla y se lava con etanol al 70%, centrifugándose a continuación 5 minutos a 14000 rpm. Finalmente, se adicionan 50 µl de amortiguador TE y se deja resuspender por lo menos 1 hora

Método c: Es idéntico al método b, salvo que incluye un pretratamiento con EDTA. Se toman 1.5 mL del lodo y se centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos. Se agrega 5 ml de EDTA 0.1M y se agita el tubo en un vortex durante 1 minuto, dejándose reposar otro minuto. Este proceso se repite 10 veces y a continuación se centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos, se recupera la pastilla y se lava con una solución isotónica de cloruro de sodio 0.9%. Se centrifuga de nuevo a 14000 rpm durante 5 minutos y se recupera la pastilla. A partir de aquí se sigue el mismo procedimiento descrito para el método anterior.

4.6.2. Obtención de ADN bacteriano a pequeña escala.

El siguiente protocolo es una modificación del descrito por Fernández (1997). Se toman 40 mL del cultivo y se centrifugan a 10000 rpm durante 5 minutos. Se recupera la pastilla, se machaca con ayuda de un mortero, hielo seco y etanol. Se recoge el polvo obtenido en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A continuación se añaden 0.35 mL del amortiguador de ruptura I (Anexo A), se homogeneiza la mezcla y se añaden 0.35 mL de fenol neutro y 0.35 mL de CIA. Se mezcla con suavidad y se incuba a 50°C durante 20 minutos (a los 10 minutos de incubación debe mezclarse de nuevo). Transcurrido este tiempo, se centrifuga a temperatura ambiente y 14000

rpm durante 5 minutos y se recupera la fase acuosa. Se realizan extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta obtener una interfase limpia. A continuación se hace una extracción con un volumen de CIA y se precipita el ADN a -20°C con 2.5 volúmenes de etanol y 0.25 volúmenes de acetato de sodio 3M, durante al menos 2 horas. Se centrifuga a 4°C y 14000 rpm durante 20 min., se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol al 70% (v/v). Finalmente, el precipitado se seca y se resuspende en TE. También se le realiza un tratamiento con ARNasa como en los métodos anteriores.

4.6.3. Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

La técnica consiste de tres pasos sucesivos que conforman un ciclo, el cual se repite alrededor de 30 a 40 veces. El primer paso es la desnaturalización, en donde la doble hélice de ADN se abre debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno, como consecuencia de la elevada temperatura ($92-96^{\circ}\text{C}$) El segundo paso es la hibridación de los cebadores, que se logra al disminuir la temperatura y permitir la unión de los cebadores con la molécula de ADN blanco. La temperatura óptima para la hibridación esta determinada fundamentalmente, por la composición de nucleótidos de los dos cebadores. Por último, el tercer paso, es la elongación, que consiste en la síntesis de las cadenas complementarias al ADN molde por acción de una ADN polimerasa (Figura 7). La temperatura generalmente usada para este paso es de 72°C

Las amplificaciones de los genes *nirS* y *nirK* fue realizada en muestras de lodo y cultivos axénicos, en un volumen final de reacción de 50 μl , donde se incluyen 5 μl de amortiguador PCR 10X sin magnesio, de 1.5 μl a 5 μl de cloruro de magnesio 50 mM (concentración final 1.5-5 mM) , 200 μM de la mezcla de nucleótidos, 2.0 U de Taq DNA polimerasa, (5 $\text{U}/\mu\text{l}^{-1}$), 40 pmol de cada cebador y de 50 a 100 ng de ADN. Se diseñaron los cebadores (Tabla 6), pero son iguales a los descritos por Braker y col. (1998), salvo que se les adicionó un sitio de corte para *EcoRI*. Tras un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min., la PCR fue realizada con un

paso de desnaturalización a 94°C durante 1 min., un paso de hibridación de 1 min. y un paso de elongación a 72 °C durante 1min, repetido 30 ciclos. Para finalizar se dio un tiempo de incubación de 10 min. a 72 °C. El producto de la PCR fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) y se visualizó tras teñirse con bromuro de etidio (0.5 mg/L).

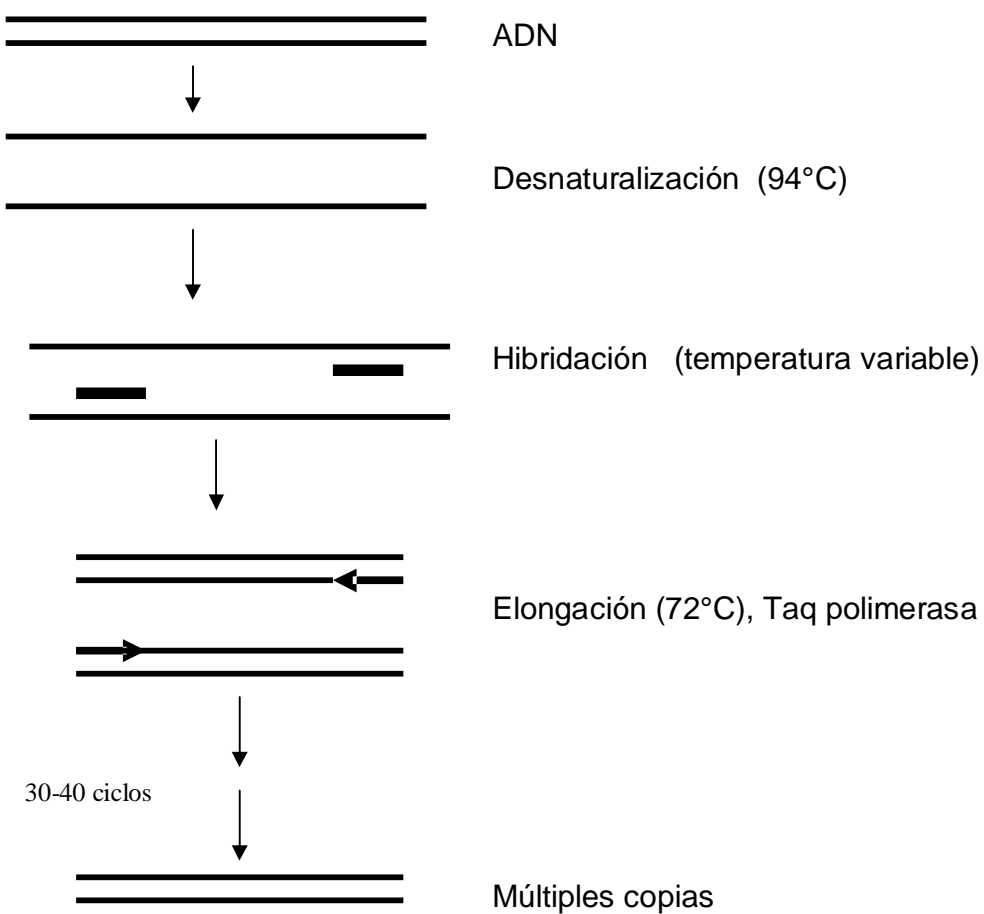


Figura 7. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa

Para determinar la temperatura de hibridación en la que hubiera una mejor definición de bandas se realizó un gradiente de temperatura de 48°C a 64°C. Posteriormente se realizó un gradiente de concentración de MgCl₂ en el tampón de reacción entre 1.5 - 5 mM de MgCl₂, para identificar la concentración adecuada para la realización de la PCR.

Tabla 6. - Secuencias de los cebadores para nirS y nirK

CEBADOR^a	SECUENCIA 5' → 3'
KF	TAT GAATTC GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA
KR	CAC GAATTC GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TG
SF	ATAG GAATTC TACCACCC(C/G)GA(A/G)CCGC
SR	GCG GAATTC CGTTGAACTT(A/G)CCGGT

^a Los cebadores son indicados por K para el gen *nirK* y S para el gen *nirS*, los cebadores “forward “ y “reverse” son indicados por las letras F y R respectivamente. En negrita se marca el sitio de reconocimiento y corte para *EcoRI*

4.6.4. Extracción de ADN del gel de agarosa

Una vez que se encontraron las condiciones adecuadas para la amplificación se realizó la PCR para obtener un fragmento utilizable como sonda en los experimentos posteriores. El producto se aisló del gel de agarosa por el método de extracción QUIAEX II (Quiagen), método más caro aunque más eficiente que el método de extracción por centrifugación y congelación a través de lana de vidrio.

4.6.4.1. Extracción por QUIAEX II

Por este método se pueden extraer fragmentos de 40 pb- 50 kpb de ADN de geles de agarosa de 0.3 –2%, o de geles de agarosa de bajo punto de fusión. El protocolo es el siguiente.

1. Se corta la banda de ADN del gel de agarosa, tratando de que el corte sea preciso (para minimizar la cantidad de agarosa a eliminar)
2. Se pesa el trozo de gel en un tubo eppendorf. Para fragmentos de DNA de 100 pb – 4 kpb se adiciona 3 volúmenes del amortiguador QX1 (ver anexo A) por cada volumen de gel. Si el fragmento de ADN tiene un tamaño menor a 100 pb se adicionan 6 volúmenes de amortiguador QX1. Si el fragmento es mayor a 4 kpb se adiciona 3 volúmenes de QX1 y dos volúmenes de agua.
3. Se resuspende por agitación en un vortex la resina QUIAEX II durante 30 seg. Si el fragmento contiene cantidades menores o iguales a 2µg de ADN se adicionan 10 µl de resina. Si el fragmento contiene entre 2 – 10 µg de ADN se adicionan 30 µl de resina. Por cada 10 µg adicionales de ADN deben adicionarse 30 µl de resina.
4. Se incuba a 50°C durante 10 minutos, para solubilizar la agarosa y que el ADN se adsorba en las partículas de silica gel agitándose cada dos minutos. En este paso debe observarse que el color de la solución sea amarillo. Si el color es naranja o púrpura, se adicionan 10 µl de acetato de sodio 3M pH 5 y se mezcla.
5. Se centrifuga la muestra 30 segundos y se desecha el sobrenadante con una pipeta.
6. Se lava el precipitado con 500 µl de amortiguador QX1. Se resuspende el precipitado agitando con vortex, se centrifuga y se retira el sobrenadante.
7. Se lava el precipitado con 500 µl de amortiguador PE. Se resuspende el precipitado agitando con vortex antes de centrifugar. Por último, se retira el sobrenadante

8. Se deja secar el precipitado de 10 – 15 minutos

9. El ADN se eluye añadiendo 20 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8.8, o agua estéril. Si el fragmento es menor de 4 kpb se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Si el fragmento es de 4 – 10 Kpb se incuba a 50°C, 5 minutos. Para fragmentos de ADN mayores a 10 kpb la incubación debe llevarse a cabo a 50°C, durante 10 minutos.

10. Se centrifuga 30 segundos a 14000 rpm y se recupera el sobrenadante, que contiene el ADN.

4.6.5. Clonación

Una vez obtenido el ADN (fragmento de 800 pb del gen *nirS*), se continua con la clonación.

1. Se recomienda que para una cantidad de ADN vector de entre 10 y 40 ng se le añada una cantidad equimolar de ADN inserto. En este trabajo se emplearon 5 μ l de ADN de inserto y 0.5 μ l (25 ng) del ADN vector. El vector utilizado fue el pGEM-T (Promega) y el inserto el fragmento del gen *nirS* que se obtuvo en el procedimiento anterior.
2. Se añade la cantidad de agua necesaria para alcanzar un volumen final de reacción de 10 μ l y se calienta la mezcla a 65°C durante 15 seg.
3. Se enfría inmediatamente la mezcla en un baño de hielo, se añaden 2 μ l de del amortiguador de reacción 5x para la ADN ligasa y 1 μ l (5 unidades) de ADN ligasa
4. Se incuba la reacción a 14°C durante 12 horas. Las nuevas moléculas formadas (vector + inserto) serán transformadas a continuación en *E.coli*

4.6.6. Transformación de células competentes.

El método de transformación de células competentes de *E. coli*, empleado fue el descrito por Hanahan (1983). Los pasos del protocolo son los siguientes:

1. Se descongelan las células competentes de *E. coli* en un baño de hielo. Se mezcla el ADN con 100 µl de una suspensión de células competentes, manteniéndose en hielo durante 20 min.
2. Se somete la mezcla a un choque térmico, sumergiéndola en un baño a 42°C durante 45 segundos, e inmediatamente después se coloca en un baño de hielo durante 3 minutos.
3. A continuación, se adicionan 800 µl de medio LB (Anexo B) y se incuba a 37°C y 250 rpm durante una hora, con el fin de que las células expresen la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de transformación
4. Se siembra una alícuota en placas de LA (ver anexo B). Al medio debe añadirse el antibiótico utilizado (penicilina), IPTG (0.1M) y X-Gal (160 µl/100mL de una preparación de 50 mg/mL en dimetilformamida) para poder seleccionar las colonias transformadas (color azul)
5. Se incuban las placas de manera invertida a 37°C .

4.6.7. Obtención de ADN plasmídico

El método utilizado es una modificación del descrito por Holmes y Quigley (1981)

1. Se pica una colonia con un palillo estéril y se inocula en un tubo Eppendorf estéril con 1 mL de medio TB y el antibiótico adecuado. Se incuba toda la noche (12-16 horas) a 37 °C con agitación (250 rpm).
2. Se centrifuga por 5 min. a 10,000 rpm, se retira el sobrenadante y el exceso de medio. El precipitado obtenido se resuspende en 350 µl de STET (Anexo A) y se le añaden 10 µl de una solución de lisozima (10 mg/mL).

3. Se mezcla durante 30 segundos y se hierva durante 45 segundos. Se centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos. El precipitado contiene ADN cromosómico, proteínas y restos celulares y se retira la pastilla con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipita al añadir 40 μ l de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 μ l de isopropanol e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Se centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70%. Se seca y la pastilla se resuspende finalmente en 30 μ l de solución TE.

Una vez obtenido el ADN plasmídico se verifica que el inserto sea el correcto (gen *nirS*), mediante una secuenciación y posteriormente se compara la secuencia en la base de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov). Después de este análisis se puede utilizar el ADN (inserto) como sonda.

4.6 .8. Transferencia, marcaje de sondas e hibridación de ácidos nucleicos

Los métodos utilizados, han sido fundamentalmente los descritos por Sambrook y *col.* (2001).

4.6.8.1. Transferencia de Southern

Previo a la transferencia se realiza la digestión de las muestras, en este caso se utiliza *Eco RI* y *Not I*, desarrollándose una electroforesis posterior a 20 mV.

1. Una vez realizada la electroforesis se tiñe el gel y se fotografía.
2. Después se trata el gel con una solución 0.25 N de HCl durante 15 minutos, con agitación moderada. Transcurrido el tiempo, se lava el gel con agua destilada.

3. El gel se sumerge en una solución desnaturalizante (ver anexo A) durante 30 minutos con agitación. A continuación se lava con agua destilada y se sumerge en la solución neutralizante (ver Anexo A) durante 30 minutos.
4. Se colocan papeles de filtro de las mismas dimensiones que el gel (un conjunto de unos 5 cm de grosor) previamente humedecidos con el amortiguador de transferencia SSC 10X, sobre una bandeja limpia.
5. Después se colocan dos láminas de papel Whatman 3MM, sobre esto una membrana de nilón, de un tamaño 1 cm mayor, de ancho y largo, que el gel. La membrana se humedece antes de ser colocada sobre el gel, sumergiéndola en agua destilada y luego en el amortiguador de transferencia SSC 10X.
6. Sobre la membrana se colocan dos laminas humedecidas con el amortiguador de transferencia, de papel Whatman 3MM de las mismas dimensiones que el gel y sobre ellas de nuevo papel de filtro (un conjunto de unos 10 cm de grosor). En la parte superior del sistema se coloca un objeto de aproximadamente ½ kilogramo de peso y se añade el amortiguador de transferencia a la bandeja hasta que alcance casi el límite superior del papel de filtro colocado en la parte inferior del sistema. Se mantiene así durante un mínimo de 12 horas. Es importante eliminar las burbujas que se formen al superponer las distintas capas de papel, para evitar interferencias en el desarrollo normal de la transferencia.
7. Transcurrido el tiempo, se marcan los pocillos del gel en la membrana y ésta se lava en una solución SSC 5x. Se deja secar el filtro y se fijan covalentemente los ácidos nucleicos a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta.

4.6.8.2. Marcaje de sondas

El ADN usado como sonda debe de marcarse para su posterior detección. Una forma de marcarlo es mediante isótopos radiactivos, como el ^{32}P , isótopo que emite partículas β y tiene una vida media de 14 días. Para este fin se utilizó la técnica de desplazamiento de mellas (“nick translation”). Esta técnica utiliza dos enzimas: la ADNasa I, endonucleasa que rompe de manera inespecífica las cadenas de ADN generando extremos 3'-OH libres, y la ADN polimerasa I, que puede desplazar esas rupturas o mellas debido a su actividad exonucleasa 5' – 3' y polimerasa 3'-.5' (Rigby y col., 1977). La polimerasa I introduce de esta forma, el nucleótido marcado radioactivamente

1. Los componentes de la mezcla de marcaje son los siguientes:

ADN	6 μl (100 ng)	Amortiguador de marcaje 10x*	2 μl
dATP 0.4M	1 μl	Mezcla de enzimas*	2 μl
dGTP 0.4 M	1 μl	dCTP (^{32}P)	2 μl
dTTP 0.4M	1 μl	Agua	5 μl

* Ver anexo A

Se incuba a 15°C durante 30 minutos la mezcla de marcaje y posteriormente se enfría en un baño de hielo y agua

2. La eliminación del isótopo radioactivo no incorporado a la sonda se realizó con el sistema “Magic-clean” (Promega), de acuerdo con instrucciones del fabricante. Se añade a la reacción de marcaje 1 mL de la resina “Clean up”, colocando la mezcla en una columna comercial con ayuda de una jeringa de 5 mL. Se retira el sobrenadante y la resina queda retenida en la columna. A continuación se lava con 2 mL de isopropanol al 80% (v/v). Se coloca la columna en un tubo Eppendorf y se centrifuga a 14000 rpm durante 10 segundos para eliminar el isopropanol. Se cambia el tubo

Eppendorf por uno nuevo y se añaden 100 μl de agua estéril (previamente calentada a 80°C), se deja en reposo 30 segundos y se centrifuga a 14000 rpm durante 10 segundos

3. Al líquido recuperado se le añade 1 mL de agua estéril y se hierve durante 10 minutos, a continuación se coloca en un baño de hielo durante 5 minutos. En este punto la sonda está en condiciones de ser utilizada.

4.6.8.3. Hibridación

La hibridación incluye tres pasos: la prehibridación, que tiene como objetivo bloquear los sitios de la membrana donde no se han unido los ácidos nucleicos; la hibridación, que permite la unión de la sonda con los ácidos nucleicos fijados a la membrana y, por último los lavados, que eliminan la unión inespecífica que haya podido producirse.

4.6.8.3.1. Prehibridación.

1. Se introduce el filtro en un tubo de hibridación y se añade el amortiguador de hibridación I (ver anexo A), suplementado con ADN de esperma de salmón (ver anexo A), en una concentración final de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Es importante no superar un volumen de 100 μl de amortiguador de hibridación por cm^2 de membrana, para favorecer el contacto de la sonda con los ácidos nucleicos.
2. Se incuba a 42°C durante 4-12 horas.

4.6.8.3.2. Hibridación.

Se desecha el amortiguador utilizado y se añade un nuevo amortiguador de hibridación con una concentración final de esperma de salmón de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se añade la sonda de ADN marcada y desnaturalizada

1. Se incuba a 42°C durante 12-24 horas.

4.6.8.3.3. Lavados

1. Se vierte el amortiguador radioactivo en un recipiente reservado para almacenamiento de sustancias radioactivas
2. Se realiza un primer lavado con 500 mL de amortiguador de lavado I (Anexo A) durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Se desecha el líquido y se realiza un segundo lavado con el amortiguador de lavado II (Anexo A). Si es necesario se realizarán uno o más lavados con el amortiguador de lavado II
3. Se expone la membrana con un film Hyperfilm-MP, en un estuche con pantallas intensificadoras, a -70°C durante un tiempo que debe ser determinado experimentalmente.

4.6.9. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)

Para el desarrollo de esta técnica se utilizaron dos cebadores, el cebador F01, cuya secuencia es 5´-ACG-CGC-CCT - 3', y el cebador A09, cuya secuencia es 5´-GGG-TAA-CGC-C-3' (con una Tm de 44.4°C y 34°C respectivamente). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen total de 50 µl, incluyendo 5 µl de amortiguador PCR 10X sin magnesio, 2.5 µl de cloruro de magnesio 50 mM (concentración final 2.5 mM), 200 µM de la mezcla de nucleótidos, 2.0 U de Taq DNA polimerasa (5 U/µl), 40 pmol de cebador y de 50 a 100 ng de ADN. Las amplificaciones fueron realizadas en termociclador programado para 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 34 ó 40 °C dependiendo del cebador (A09 y F01, respectivamente) y 90 segundos a 72 °C. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v) y teñidos con bromuro de etidio en las condiciones ya descritas.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1.- Estabilización del proceso desnitrificante

En la alimentación del reactor se suministró el carbono en forma de acetato y el nitrógeno en forma de nitrato. En la Figura 8 se muestra el comportamiento del consumo de los compuestos carbonados durante 220 días de operación. La eficiencia de eliminación del C-acetato fue del $95.4 \% \pm 3.1\%$

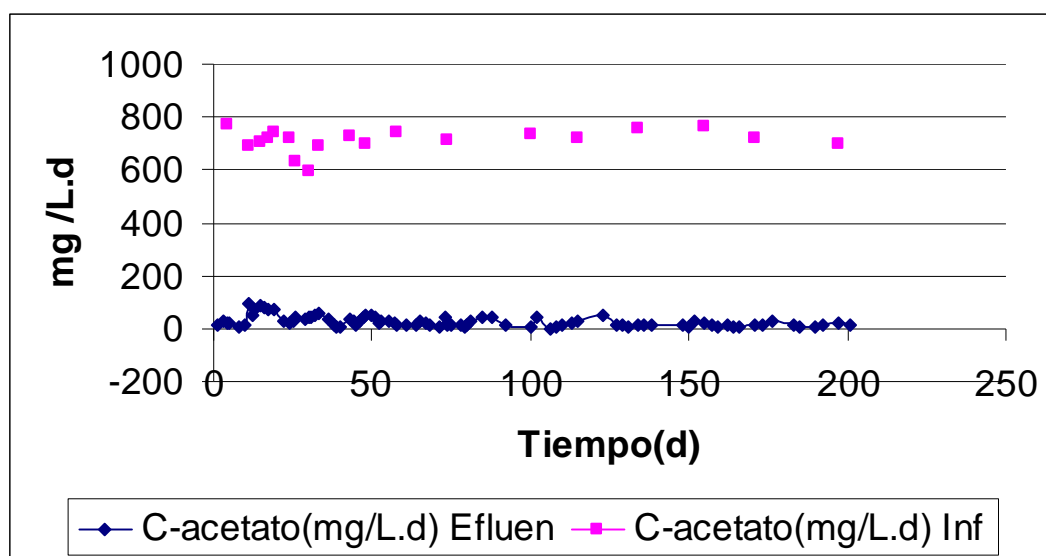


Figura 8.- Perfil de comportamiento del acetato en el influente y efluente del reactor con TRH de 2 días

En la Figura 9 se muestra el perfil de los compuestos nitrogenados. La velocidad de carga de $N-NO_3$ a la entrada fue de 500 mg /L.d , no detectándose la presencia de $N-NO_3$ en la salida (la eficiencia de eliminación de $N-NO_3$ fue del 99.86%). El rendimiento desnitrificante (Y_{N_2}), es decir, el nitrógeno molecular producido con respecto al nitrógeno consumido, fue de $0.91 \text{ g } N_2 / \text{ g } N-NO_3^-$.

La velocidad volumétrica de producción de N_2 fue de $455 \pm 43 \text{ mg /L.d}$. El valor de la dispersión muestra claramente que la velocidad fue constante y muy poco variable,

por lo tanto, la desnitrificación estuvo operando en régimen estacionario. No se detectó la formación de óxido nitroso (N_2O), aunque ocasionalmente se observó la presencia de nitrito (NO_2^-) en pequeñas concentraciones. No hubo formación considerable de amonio (NH_4^+)

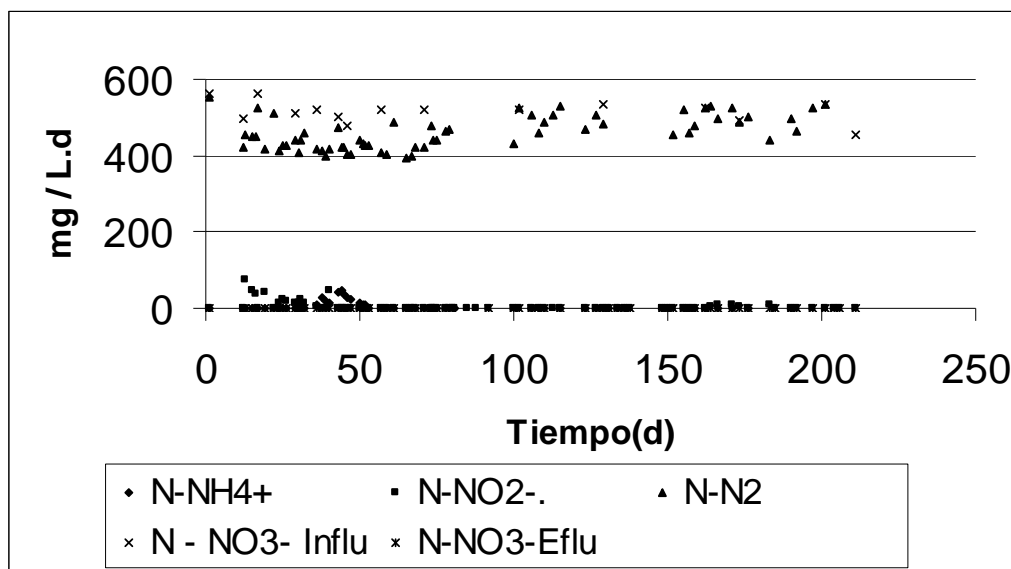


Figura 9. Perfil de los compuestos nitrogenados durante el proceso desnitificante en continuo

En lo que respecta a la formación de biomasa, no se observó un incremento significativo dentro del reactor, manteniéndose como media 1.468 (SSV)g/ L.d con un coeficiente de variación del 3.9 % (Tabla 7). Por lo tanto, se puede decir que la formación de biomasa fue despreciable durante el cultivo en continuo y que el metabolismo se orientó hacia un proceso respiratorio desasimilativo, ya que el nitrógeno de nitrato y el carbono de acetato se orientaron a la formación de productos. Lo anterior era de esperarse ya que la C/N utilizada fue la estequiométrica (1.4) (Pérez, 1998).

En base a los resultados anteriores, se puede decir que el proceso desnitificante operó bajo condiciones constantes y estables, desde el punto de vista metabólico. En estas condiciones se llevaron a cabo los análisis microbiológicos.

Tabla 7. Sólidos suspendidos volátiles dentro del reactor y en el efluente

Día	SSV(g/L) reactor	SSV (g/L) Efluente
33	1.49	0.282
36	1.39	0.242
71	1.46	0.176
73	1.36	0.156
$X \pm \sigma$	1.468 ± 0.057	0.202 ± 0.058

5.2. Aislamiento de microorganismos desnitrificantes

De la siembra en placa, tubo y botella del lodo desnitrificante en estado estacionario se aislaron, cinco colonias de bacterias (Tabla 8) de morfología colonial distinta. Todas las bacterias aisladas fueron bacilos móviles. En la Figura 10 se observa el crecimiento en placa de la colonia C, cuyas colonias presentan bordes rugosos y translúcidos, con centro color crema (apariencia de huevo frito).

Tabla 8. Características de las bacterias aisladas

	Morfología Colonial	Morfología Microscópica	Producción de N ₂
A	Colonia grande, lisa, mucosa color crema	Bacilos pequeños móviles	+
B	Colonias pequeñas de bordes irregulares	Bacilos móviles	+
C	Colonias de bordes rugosos, translúcidos y centro crema	Bacilos móviles formando cadenas	+
D	Colonias translúcidas, con centro abultado	Bacilos delgados móviles	+
E	Colonias translúcidas, con centro abultado, bordes lisos	Bacilos pequeños móviles	+

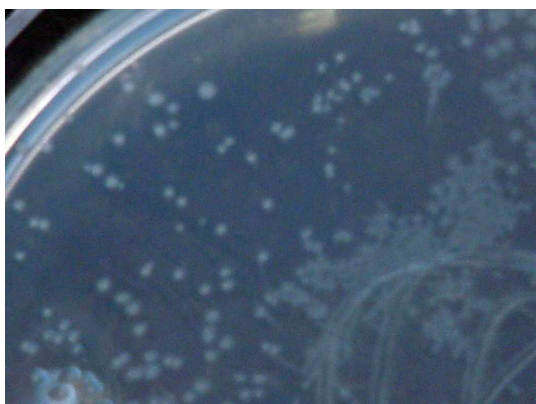


Figura 10. Crecimiento en placa de la cepa C

Para comprobar la actividad desnitrificante, las colonias fueron propagadas y luego inoculadas al 10% (v/v) en botellas con acetato y nitrato. Se mantuvieron a una temperatura de 30°C, con agitación de 150 rpm y sin controlarse el pH. Se hicieron mediciones a diferentes tiempos para constatar la eliminación de nitrato y carbono, así como la formación de N₂. Sólo se presentan los datos de las colonias A, C y D. Aproximadamente a las 30 h, el C- acetato fue consumido casi en su totalidad por las cepas D y C, mientras que la cepa A se tardó un poco más (Figura 11).

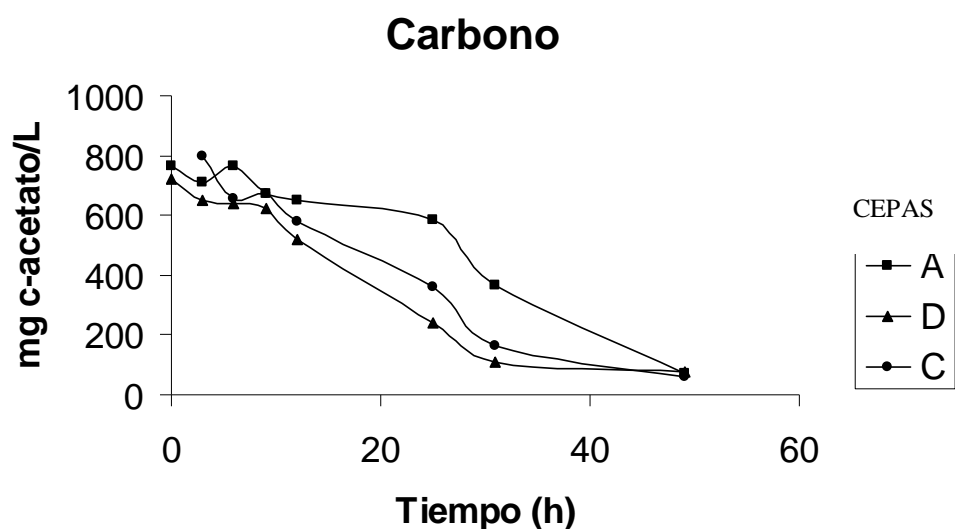


Figura 11. Cinética del consumo de C- acetato de las cepas A, C y D

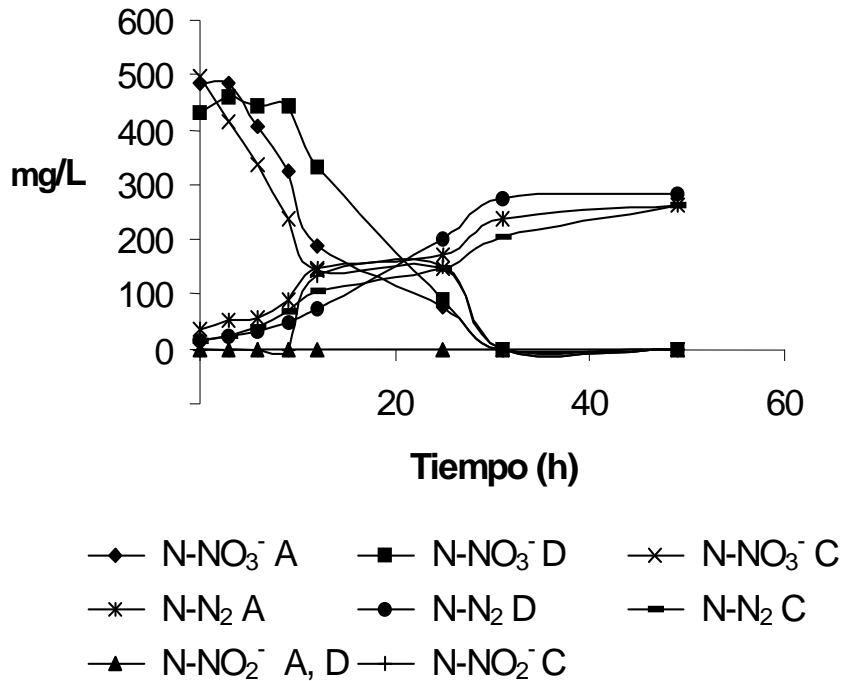


Figura 12. Perfiles de consumo de nitrato y formación de producto de las cepas A, C y D.

En la Figura 12 puede observarse que aproximadamente a las 25 horas el N-NO₃ presente en las botellas ha desaparecido. A las 9 horas empieza el consumo del N-NO₃, y la formación de N₂. Únicamente en la cepa C se observó la formación de N-NO₂⁻, alrededor de las 12 horas, desapareciendo a las 30 horas. Cabe destacar que el perfil de consumo de los cultivos axénicos probados se parece al del lodo, aunque la concentración que se manejó, es este último fue el doble tanto de C- acetato y como de N- nitrato. Sin embargo ambos se consumieron totalmente alrededor de las 25 horas. Se calcularon los rendimientos desnitrificantes (YN₂) de las cinco colonias, los cuales son muy parecidos (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento desnitrificante de las colonias aisladas

Colonia	A	B	C	D	E
YN ₂ (g N ₂ / g N-NO ₃ ⁻)	0.53	0.49	0.53	0.57	0.56

5.3. Estabilización del proceso metanogénico

En la alimentación del reactor se suministró el carbono en forma de acetato y el nitrógeno en forma de sulfato de amonio. En la Figura 13 se muestra el comportamiento de los compuestos carbonados. Durante los primeros 30 días no hubo producción significativa de metano dentro del reactor. Esto se debió posiblemente a que en la formulación del medio no estuvo contemplado el NiCl₂ y

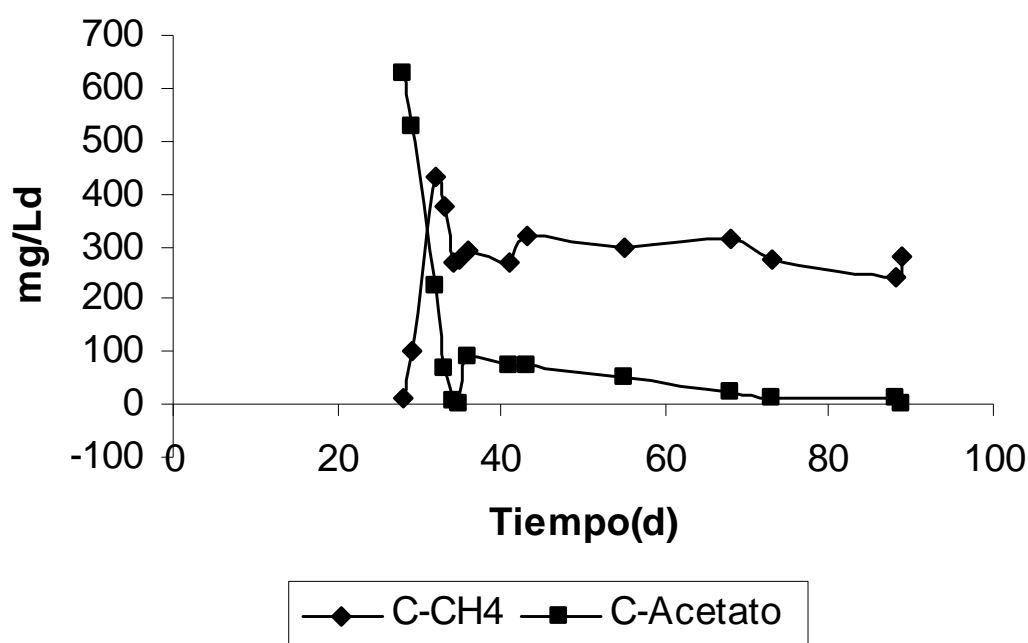


Figura 13. Perfil de compuestos carbonados en el proceso metanogénico, expresados como velocidad de carga de los compuestos carbonados en función de la velocidad de carga (Q) en mg /Ld.

el CoCl_2 . El primero es un cofactor de la coenzima F_{430} para la realización de la metanogénesis. Kida y col.(2001) , sugieren que el Ni^{2+} y Co^{2+} son requeridos para la producción de metano, incrementando la coenzima F_{430} . Además pudo deberse también al crecimiento de los metanógenos.

Después de la adición de las sales mencionadas arriba, se incrementó la producción de metano, alcanzando el estado estacionario con una velocidad de producción de metano de $283 \pm 21.8 \text{ mg C-CH}_4/\text{Ld}$ y un rendimiento de $0.86 \text{ g C-CH}_4 / \text{g C- acetato}$. En estas condiciones fisiológicamente estables, se analizó molecularmente el estado microbiológico del lodo.

5.4.- Análisis microbiológico

5.4.1.- Número más probable

Se hizo la cuantificación por NMP de microorganismos desnitrificantes y metanogénicos en el lodo, durante los dos procesos respiratorios en el estado estacionario. Como se observa en la Tabla 10, durante la desnitrificación la población desnitrificante fue superior dos órdenes de magnitud, respecto a la metanogénica. Cuando el reactor estuvo produciendo metano la población metanogénica fue superior en cuatro órdenes de magnitud a la desnitrificante. La población desnitrificante disminuyó un orden de magnitud al pasar del proceso desnitrificante al metanogénico, mientras que la población metanogénica, por el contrario, aumento cinco ordenes de magnitud. Al parecer hubo un incremento importante de la población metanogénica y una disminución de la población desnitrificante. De cualquier modo, no hay que olvidar que la técnica del número más probable puede sobreestimar o subestimar el número de microorganismos (Elferink y col., 1998; Michotey y col., 2000). Por otro lado, hay información que sugiere que la población microbiana cultivable es alrededor del 1-15 % de los microorganismos (Atlas y Bartha, 2002). Así es probable que mediante el NMP se dejen fuera del

análisis a los microorganismos viables no cultivables. Si se consideran estos hechos, además de que el conteo microbiano se hace después de varias diluciones, las diferencias observadas, deberán tomarse con las reservas del caso.

Tabla 10. Cuantificación por NMP del mismo lodo en condiciones desnitrificantes y metanogénicas

Población	L. en condiciones desnitrificantes (No de bacterias / gSSV)	L. en condiciones metanogénicas (No de bacterias / gSSV)
Desnitrificante	6.9×10^{10}	6.86×10^9
Metanogénica	8.4×10^8	1.11×10^{13}

5.5 .- Análisis molecular

5.5.1. Comparación de métodos de extracción de ADN del lodo

Se midió la concentración del ADN obtenido mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro, considerando que un valor de 1, en esas condiciones, equivale al que presenta una solución acuosa con aproximadamente 50 µg/mL de ADN de cadena doble. La determinación de la absorbancia de la muestra a 280 nm nos permite calcular la relación DO_{260}/DO_{280} , que proporciona una estimación de la pureza de la muestra (Warburg y *col.*, 1942; Glacel, 1995; Manchester, 1995 y 1996; Wilfinger y *col.*, 1997; Sambrook y *col.*, 2001). Así, preparaciones puras de ADN o ARN dan como resultado cocientes de 1.8 ó 2.0, respectivamente, mientras que valores inferiores a éstos significan contaminación por proteínas o fenol (Sambrook, y *col.*, 2001). Los ácidos nucleicos absorben más fuertemente que las proteínas a 260 nm y sólo una elevada cantidad de proteína en la muestra puede ser causa de un cambio significativo en el cociente DO_{260}/DO_{280} .

Los resultados se muestran en la Tabla 11, observándose en ellos que la utilización del método basado en el empleo de EDTA y macerador (método C) permitió obtener ADN de una menor pureza, en comparación con los otros dos métodos empleados.

Tabla 11. Comparación de los métodos de extracción de ADN

Método	$\mu\text{g} / \text{mL}$	Pureza ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$)
A - Hielo seco y etanol	3550	1.89
B - Macerador	2875	1.85
C - EDTA y macerador	1700	1.42

Por otra parte, para evaluar la integridad o grado de fragmentación del ADN aislado, se realizó una electroforesis con el ADN de lodo extraído por los tres métodos en estudio. Los resultados muestran que con el método A (hielo seco y etanol) se obtuvo un ADN de mayor tamaño que con los métodos B (macerador) y C (EDTA y macerador) (Figura 14).

En trabajos precedentes, Miller y *col.* (1999) realizaron un estudio comparativo de nueve procedimientos de extracción, encontrando que el mejor de ellos fue la homogenización (con molino o macerador) combinada con el tratamiento con dodecil sulfato de sodio (SDS). Los autores obtuvieron tamaños de ADN de entre 16 y 20 kpb con la técnica combinada, superiores a los obtenidos cuando utilizan sólo el macerador (13 kpb). En el presente trabajo se obtuvieron resultados semejantes en cuanto al tamaño, ya que al utilizar el macerador se obtuvo mayoritariamente un ADN con un tamaño aproximado de 12 kpb.

La elección del método de extracción, sin embargo, no se basó en el tamaño del material obtenido, debido a que el ADN obtenido por cualquiera de los tres métodos era susceptible de ser utilizado, de acuerdo a este criterio, en las etapas posteriores del estudio (se pretendía amplificar un fragmento de tan solo unos 800 pares de nucleótidos). La elección preferentemente se fundamentó en los criterios de pureza (cuantificada por medio de la relación descrita anteriormente) y rapidez de ejecución.

De esta forma, en primer lugar se descartó el método C por la baja pureza del ADN obtenido de esta forma. El método A, resultó superior a los otros dos en cuanto al tamaño del ADN obtenido, sin embargo es un procedimiento más lento y laborioso que el método B, siendo éste último el elegido, debido a que es más rápido y se obtiene la misma pureza que con el A.

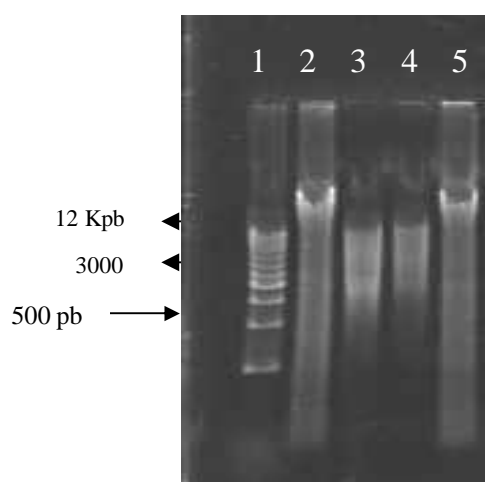


Figura 14- ADN obtenido por los distintos métodos. Carril 1: Marcador de tamaño 1 kpb, carriles 2 y 5: método A (hielo seco y etanol), carril 3: método B: macerador y carril 4: método C: EDTA y macerador.

5.5.2. Obtención de una sonda para cuantificar las poblaciones desnitrificantes

5.5.2.1. Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Utilizando como molde el ADN de lodo extraído de la forma indicada, se realizó la PCR con una temperatura de hibridación en los ciclos de 45°C (de acuerdo a la T_m de los cebadores diseñados previamente). Sin embargo, la amplificación resultó inespecífica, por lo que se decidió probar diferentes temperaturas de hibridación en

la reacción y diferentes concentraciones de $MgCl_2$ en la mezcla, de forma que se pudieran encontrar condiciones más apropiadas para la amplificación.

En el caso del gen *nirK*, sólo hubo amplificación con temperaturas de hibridación de 48 y 50°C, aunque en ambos casos fue inespecífica. Como se puede apreciar en la figura 15 (carriles 2 y 3), se obtienen múltiples productos, ninguno de ellos del tamaño esperado (de alrededor de 520 pb). Tampoco se obtienen mejores resultados con la variación en las concentraciones de $MgCl_2$ en la mezcla de reacción (resultados no mostrados)

La falta de amplificación del gen *nirK*, en ninguna de las condiciones probadas, podría ser explicada por la ausencia en la muestra analizada de microorganismos que contengan dicho gen o bien, que el agua, la concentración de $MgCl_2$ o la concentración de ADN no eran los adecuados. Los cebadores utilizados para la amplificación de este gen son muy parecidos a los diseñados por Braker y col. (1998) y la especificidad de éstos ya ha sido previamente demostrada, por lo que cabría descartar la posibilidad de un mal diseño de los mismos.

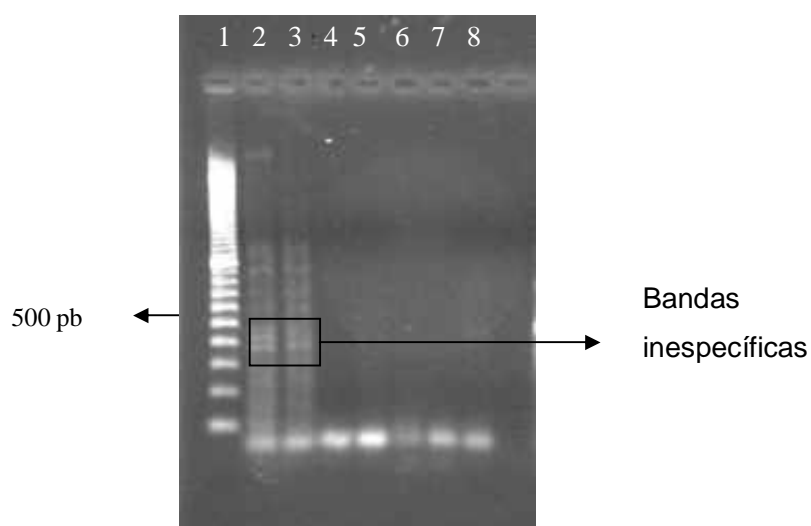


Figura 15.- Gradiente de temperaturas de hibridación para la amplificación del gen *nirK*. Carril 1: Marcador 100–2000 pb, carril 2: 48°C, carril 3: 50°C, carril 4: 53°C, carril 5: 55°C, carril 6: 57°C, carril 7: 59°C y carril 8: control ADN

Para el gen *nirS*, se probó en un principio un intervalo de 48°C a 56°C, obteniéndose solamente amplificación inespecífica (datos no mostrados). Sin embargo, estos resultados eran susceptibles de mejora (no había, como en el caso anterior, ninguna condición en la que no hubiera amplificación), por lo que se procedió a utilizar un intervalo de temperatura superior, concretamente entre 55°C y 64°C (Figura 16). La amplificación fue más específica a 62°C y 64°C, obteniéndose una banda predominante del tamaño esperado (en este caso, 800 pb) y desapareciendo bandas inespecíficas de tamaños menores. Las condiciones finales de amplificación óptima para el gen *nirS* se concretaron en una temperatura de hibridación de 64°C y una concentración de MgCl₂ de 2.5 mM,

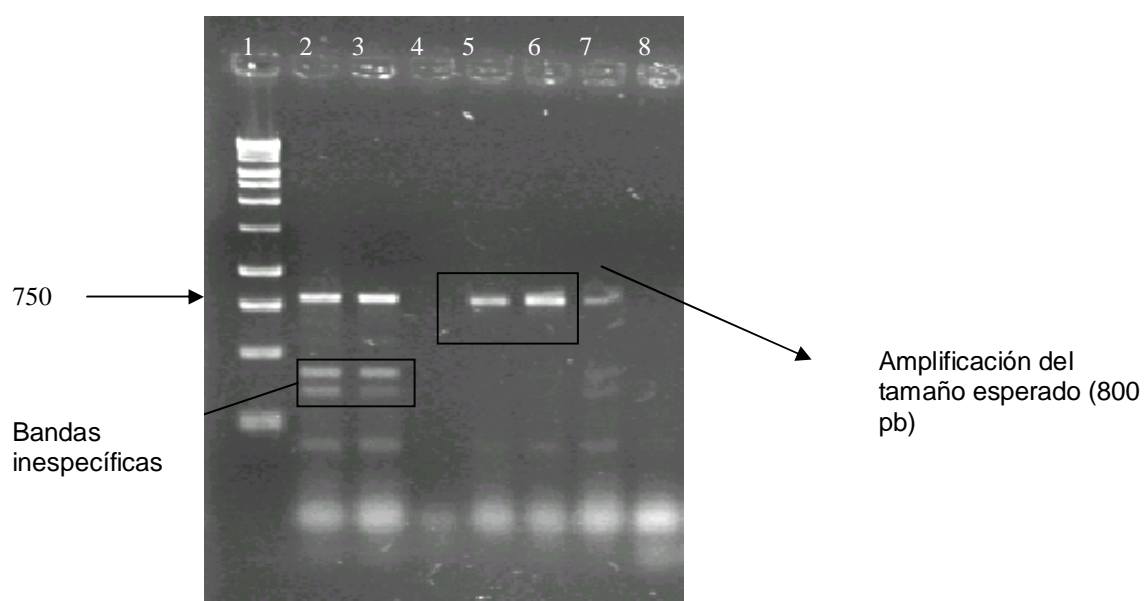


Figura 16. Gradiente de temperaturas de hibridación para la amplificación del gen *nirS*. Carril 1: Marcador de 250 a 10,000 pb, carril 2: 56°C, carril 3: 58°C, carril 4: 60°C, carril 5: 62°C, carril 6: 64°C, carril 7: 55°C y carril 8: control sin ADN

A partir de estos resultados, se decidió continuar el trabajo utilizando únicamente el gen que codifica para la nitrito reductasa citocromo cd1 (*nirS*) como marcador genético de la población desnitrificante.

5.5.2.2. Extracción de ADN del gel de agarosa

Tras realizar una PCR en las condiciones descritas, el fragmento de ADN correspondiente a las 800 pb se cortó del gel y se purificó por medio del sistema QUIAEX II (Quiagen). (Figura 17)

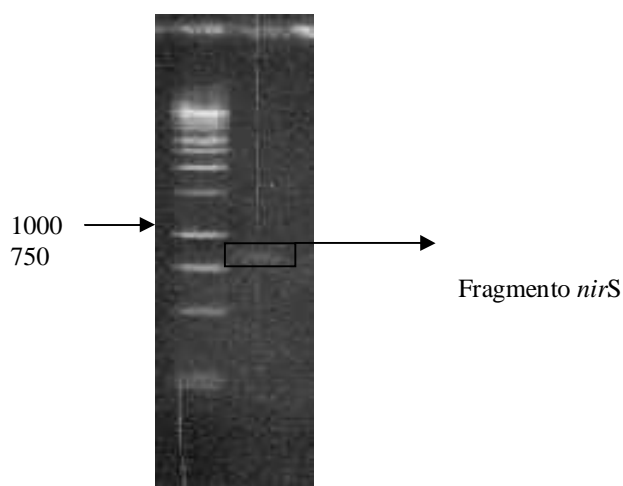


Figura 17. Fragmento del gen *nirS* obtenido mediante el sistema QUIAEX II. se utilizaron 4 μ l de muestra para conseguir que fuera visible en el gel.

5.5.2.3. Clonación

El fragmento del gen *nirS* obtenido en el apartado anterior se clono en un vector PGEM- T y posteriormente se hizo la transformación de células competente de *E.*

coli. De la siembra en placa de las células de *E. coli* transformadas se obtuvieron 10 clones. Tres de ellos presentaron un patrón adecuado tras liberar el vector (aproximadamente 3000 pb) y el inserto (fragmento de interés, de 800 pb) mediante digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRI* (Figura 18).

Los tres clones, denominados 11, 16 y 32, se eligieron para analizar la secuencia de nucleótidos de sus insertos y así poder corroborar la identidad del gen *nirS*. Una vez obtenidas las secuencias (anexos C, D y E, respectivamente) se compararon con las existentes en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando el programa Blast. De esta forma pudo confirmarse que los tres fragmentos pertenecen al gen *nirS* y son muy similares entre si, aunque hay pequeñas diferencias con el clon 32 ya que la tercer base de dos tripletes seguidos (alrededor de 880 pb) cambia, dando por resultado un cambio en el aminoácido expresado. Los tres clones tienen un 91% de similitud en nucleótidos con la cepa T1 de *Thauera aromatica* (Anexo F).

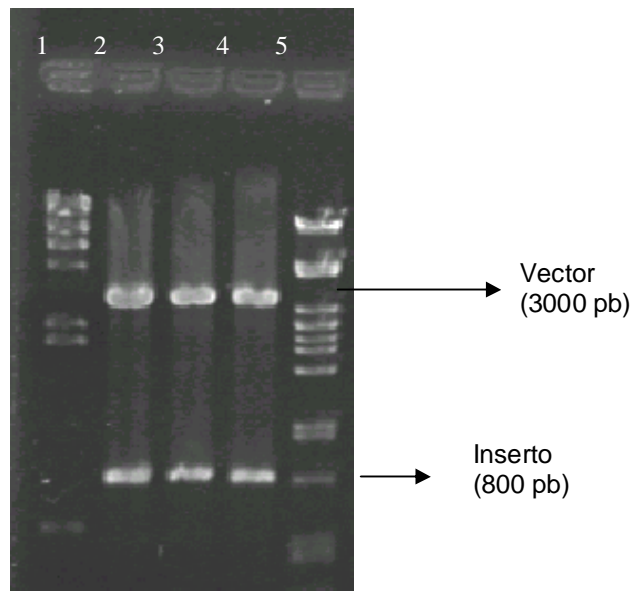
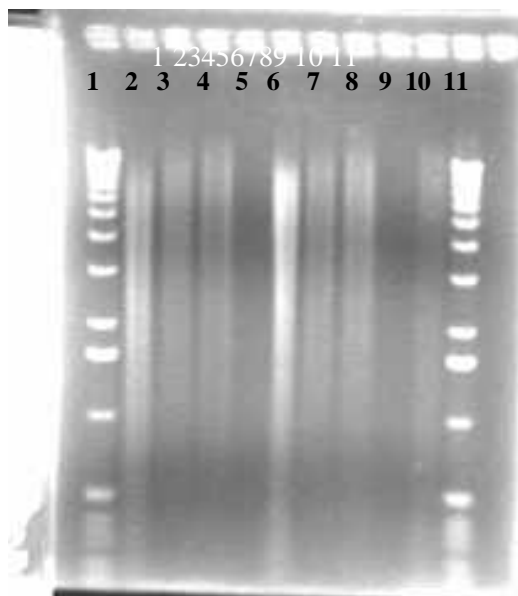


Figura 18.- Digestión de los clones 11, 16 y 32 con la endonucleasa *EcoRI*. Carril 1: Marcador (λ HindIII); carril 2: clon 11; carril 3: clon 16; carril 4: clon 32 y carril 5: marcador (λ PstI)

5.5.3.- Cuantificación de la población desnitrificante en lodos

La amplificación y clonación del gen *nirS*, gen característico de las bacterias desnitrificantes, nos permite disponer de un marcador molecular para identificar y cuantificar la presencia de poblaciones de este tipo fisiológico en muestras ambientales. Para ello, el ADN aislado de distintas muestras se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *NotI* y se sometió a electroforesis. Como se aprecia en la Figura 19, la digestión fue completa.

Posteriormente se realizó la transferencia del ADN a un soporte sólido y se procedió a hibridarlo con la sonda correspondiente al fragmento amplificado del gen *nirS*.



- Carril 1: Marcador de 506-12,216 pb (1kpb)
- Carril 2: Lodo en condiciones desnitrificantes/ *EcoRI*
- Carril 3: Lodo en condiciones metanogénicas / *EcoRI*
- Carril 4: Lodo en condiciones metanogénicas en transición / *EcoRI*
- Carril 6: Lodo en condiciones desnitrificantes / *NotI*
- Carril 7: Lodo en condiciones metanogénicas / *NotI*
- Carril 8: Lodo en condiciones metanogénicas en transición / *NotI*
- Carril 10: Colonia A (desnitrificante) / *EcoRI*
- Carril 11:- Marcador de 506-12,216 pb (1kpb)

Figura 19. Digestión de ADN obtenido de lodos en condiciones desnitrificante y metanogénico con las endonucleasas *EcoRI* y *NotI*

Únicamente se obtuvo señal de hibridación para las muestras de ADN procedentes del lodo en condiciones desnitrificantes y para la colonia A, en ambos casos fue

realizada la digestión con la enzima *EcoRI*. No hubo señal de hibridación en el resto de la membrana (Figura 20).

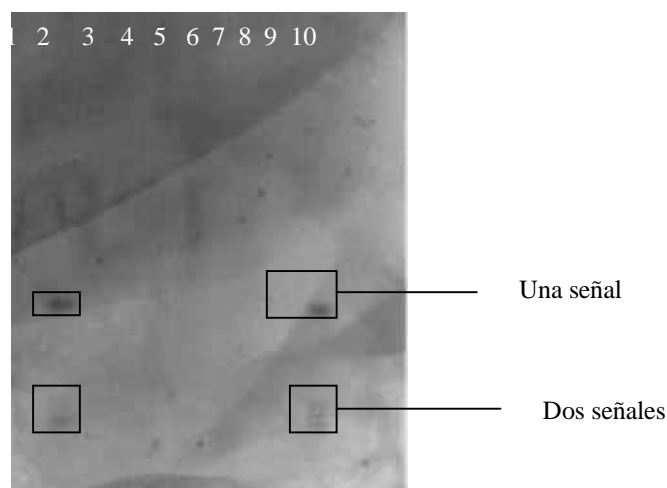


Figura 20. Southern e hibridación.- Se observan tres bandas que representan fragmentos del gen *nirS* en los carriles 2 y 10, las cuales han sido encasilladas. El carril 2 corresponde al lodo en condiciones desnitrificantes digerido con *EcoRI* y el 10 al aislado A digerido con *EcoRI* (ver figura 19)

En los dos casos se observan tres bandas o señales de hibridación (las mismas en los dos carriles, lo que da pie a especular con la posible relación entre el proceso desnitrificante del lodo y el aislado A). La presencia de más de una señal de hibridación puede deberse a que el gen *nirS* tiene cortes internos para la enzima *EcoRI*. La sonda completa podría, de esta forma, hibridar con cada uno de los fragmentos del gen obtenidos tras la digestión con la enzima.

La ausencia de señal de hibridación en el ADN procedente del lodo en condiciones metanogénicas se debe a una menor cantidad (o incluso ausencia) del gen *nirS* en las poblaciones presentes en dicho lodo.

Como se aprecia en la Figura 19 (página anterior), el carril 3 posee una menor concentración de ADN que el carril 2, pudiendo ser ésta parte de la explicación (con menos cantidad de ADN para hibridar se obtendría una menor señal de hibridación). Sin embargo, este hecho no puede por sí solo explicar la ausencia completa de la señal de hibridación, lo que parecería indicar un descenso adicional en el número de microorganismos que contienen este gen dentro del lodo en condiciones metanogénicas. Aunque este resultado no concuerda totalmente con la cuantificación realizada por NMP, ya que a pesar de hubo una disminución de 1 orden de magnitud en la población desnitrificante esta no es suficiente para no obtener señal.

La especificidad de este método es alta, como lo mencionan en sus trabajo Braker y *col.*, (1998) y Hallin y *col.*, (1999), y la sensibilidad utilizando sondas marcadas con radiactividad también. Por lo mismo, este método no sólo permite revelar la composición de las poblaciones de forma cualitativa, sino que la comparación de la intensidad de las señales de hibridación posibilita una cuantificación aproximada (Sambrook y *col.*, 2001).

5.5.4.- Comparación cualitativa de las poblaciones presentes en distintos lodos anaeróbicos

La utilización de RAPDs permite obtener patrones de amplificaciones diferentes para genomas distintos. Por ello, el análisis de lodos en distintos estados podría generar patrones idénticos, si no hubiera cambio poblacional alguno, o diferentes, en caso de que sí los hubiera. La aparición de bandas diferentes entre diferentes muestras sugiere la presencia o ausencia de alguno/s de los componentes de la población. La mayor o menor intensidad de las bandas puede ser debida a una menor concentración en la población de un determinado componente, aunque esta hipótesis debe ser tomada con mucha precaución debido al carácter no cuantitativo del método.

Se utilizó el lodo en condiciones desnitrificante y metanogénico, en estado estacionario, como fuente del ADN para realizar esta prueba. También se utilizó una mezcla de cinco bacterias desnitrificantes aisladas y una mezcla de bacterias metanogénicas aisladas del lodo. Los resultados se muestran en la Figura 21.

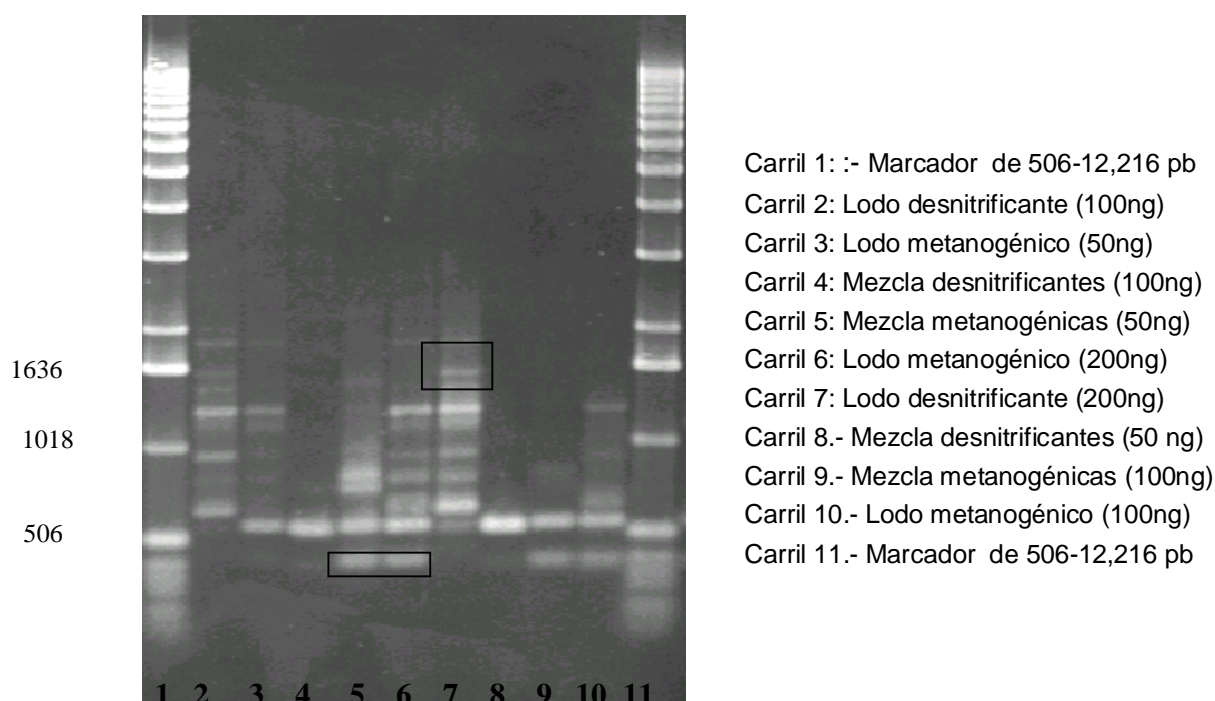


Figura 21. Análisis por RAPDs del lodo (entre paréntesis se indica la cantidad de ADN utilizado en cada caso como molde)

Comparando el patrón de bandas obtenido, se puede apreciar la existencia de bandas comunes para todos los carriles (la más clara, la que tiene un tamaño de alrededor de 600 pb). Las bandas con tamaños de alrededor de 800 y 900 pb son

también iguales para los lodos metanogénico y desnitrificante, como se puede observar en los carriles 6 y 7.

Sin embargo, también aparecen bandas específicas de cada uno de los estados. Una de ellas, recuadrada en la figura, sólo está presente en el lodo metanogénico (carril 6) y en la mezcla de bacterias metanogénicas aisladas del lodo (carril 5). Dicha banda, de alrededor de 400 pb, no está presente en lodo desnitrificante. Del mismo modo, hay dos bandas (con tamaño de alrededor de 1500 y 1300 pb), que sólo están presentes en el lodo desnitrificante (carril 7) y no aparecen en el metanogénico.

En el carril 8 sólo se amplifica una banda, de manera intensa, que podría ser representativa de la población desnitrificante (se había comprobado previamente, ver sección 3.2, que las bacterias utilizadas eran desnitrificantes).

El método utilizado es muy sensible a pequeñas variaciones de concentración y pureza de ADN, concentración de Mg^{2+} y temperatura de hibridación (Erlandson y Batt, 1997). Como puede apreciarse en los carriles 2 y 7, cuya única diferencia fue la cantidad de ADN utilizada como molde, la intensidad y número de bandas varía un poco. La comparación, pues, debe hacerse entre los carriles en los que se utilizó la misma concentración de ADN para eliminar la interferencia que pueda generar en el análisis los cambios en el patrón de bandas debidos a situaciones metodológicas.

De este modo, es posible apreciar tanto similitudes como diferencias entre las poblaciones del lodo en las dos condiciones y, en base a la evidencia, puede afirmarse que una parte de la población se mantiene (sería la relacionada con las bandas constantes) y otra cambia cuando pasamos del proceso desnitrificante al proceso metanogénico (justificable por las bandas específicas que aparecen tanto en una condición como en la otra).

Fernández y col. (1999), estudiando un reactor metanogénico aparentemente estable (eliminación de COD de 89-99%), describen que los miembros predominantes y la diversidad (dentro de los dominios Arquea y Bacteria) cambian dramáticamente en cortos periodos de tiempo, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. El reactor en condiciones desnitrificantes aquí estudiado operó en estado estacionario durante más de 200 días, con una velocidad de producción de N_2

de 455 ± 43 mg/ LD y durante ese periodo se tomaron muestras del lodo. Lo mismo ocurrió en condiciones metanogénicas, pero las diferencias encontradas no son tan grandes en nuestro caso, a pesar de que el análisis abarcó periodos de tiempo mucho más largos.

6.- CONCLUSIONES

Los datos indican que el reactor durante el proceso desnitrificante alcanzó el régimen estacionario, con velocidad de producción de N_2 de 455.4 ± 43 mg /L.d y una velocidad de consumo de 513 mg $N-NO_3^-$ / L.d. La eficiencia de eliminación de $N-NO_3^-$ fue de 99.86% y el rendimiento de 0.91 g N_2 / g $N-NO_3^-$

El reactor durante el proceso metanogénico se mantuvo en régimen estacionario, con una velocidad de producción de metano de 283 ± 21.8 con una eficiencia de producción de $C-CH_4$ del $80\% \pm 6.18$, y un rendimiento de 0.86 g $C-CH_4$ / g C -acetato.

La población desnitrificante fue superior en dos ordenes de magnitud respecto a la metanogénica, (6.9×10^{10} , 8.4×10^8 bacterias / gSSV respectivamente) en el proceso desnitrificante. En el proceso metanogénico, por su parte, la población metanogénica fue superior en cuatro ordenes de magnitud con respecto a la desnitrificante. De acuerdo a estos valores, al cambiar las condiciones del reactor de desnitrificante a metanogénico, la población desnitrificante no tuvo cambios en número (ya que disminuyó un orden de magnitud). Sin embargo la población metanogénica, tuvo un cambio mayor, al aumentar su número cinco ordenes de magnitud.

De acuerdo al análisis mediante RAPDs se deduce que debido al cambio en el patrón de las bandas observadas hubo un cambio en la composición de las poblaciones microbianas. De acuerdo a la intensidad de las bandas parecería que hubo una disminución de la población desnitrificante y un aumento de la metanogénica, lo cual concuerda con los resultados del NMP.

El mismo dato puede inferirse, esta vez a nivel cuantitativo, del análisis de hibridación con la sonda correspondiente al gen *nirS*. La población desnitrificante

disminuye durante la metanogénesis, pero de una manera que no puede detectarse con la sonda radiactiva. Este dato indicaría una variación mayor que la encontrada con la técnica de NMP.

Las evidencias muestran que al cambiar el proceso respiratorio de desnitrificación a metanogénesis, al parecer hubo una disminución de la población desnitrificante y un aumento de la población metanogénica, aunque aparentemente una parte del consorcio se mantiene sin cambios.

7.0.-BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, Z. H. L., Lowe, D.J., Smith, B.E. (1993). Purification and Characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. *Biochem. J.* **295**, 587-593.
- Andrew, C.R.; Han, J., De Vries, S., Van der Oost, J., Averill, B.A., Loehr, T.M., Sanders-Loehr, J. (1994). Cu_A of cytochrome c oxidase and the A site of N₂O reductase are tetrahedrally distorted type I Cu cysteinates. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10805-10806.
- Arai, H., Igarashi, Y., Kodoma, T. (1995). The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys. Acta.* **1261**, 279-284.
- Atlas, R. M., Batha, R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación. Madrid. pp . 696.
- Balch, W. E., Wolfe, R. S. (1979). Specificity and biological distribution of coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid). *J. Bacteriol.* **137**, 256-263.
- Balderston, W. L., Payne, W. J. (1976). Inhibition of methanogenesis in salt marsh sediments and whole-cell suspensions of methanogenic bacteria by nitrogen oxides. *Applied Environ. Microbiol.* **32**, 264-269.
- Beelen Van, P. Dukstra, A.C., Vogels, G. D. (1983). Cuantificación de coenzima F₄₂₀ in metanogénica lodo por el uso de la Fase-Reversa Alta Rendimiento Líquido Cromatografía y un detector de fluorescencia. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 67-69.
- Berks, B. C., Ricradson, D.J., Robinson, C., Reilly, A., Ferguson, S. J.(1994) Purificación y caracterización de la periplásmica nitrato reductasa de *Thiosphaera pantotropha*. *Eur J. Biochem.* **220**, 117-124.

- Berks, B.C., Ferguson, S. J., Moir, J.W.B., Richardson, D.J. (1995). Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochem Biophys. Acta.* **1232**, 97-173.
- Besson, S., Carneiro, C., Moura J. J. G., Moura, I., and Fauque, G. (1995). A cytochrome cd₁- type nitrite reductase isolated from the marine denitrifier *Pseudomonas nautica* 617: purification and characterization. *Anaerobe* **I**, 219--226
- Bobik, T.A., Olson, K. D., Noll, K. M., and Wolfe, R. S.(1987). Evidence that the heterodisulfide of coenzyme M and 7-mercaptoheptonoylthreonine phosphate is a product of methyl-reductase reaction *in Methanobacterium*. *Biochem. Biophys Res Commun.* **149**, 465-460.
- Boone, D.R., Mah, R. A (1984). Methanogenic Archaeobacteria. pp. 2173-2177. In N. R. Krieg (ed.). *Bergey's manual of sistematic bacteriology*, vol 3. Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- Boone, D., Castenholz, R., Garrity, G. (2001). Volume one. The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^a ed. Springer Verlag. New York. pp 721
- Bramucci, M., Nagarajan, V. (1999). Industrial waste water bioreactors: sources of novel microorganisms for biotechnology. *Tibtech* **18**, 501-505.
- Breen, A., Rope, A. F., Taylor, D., Loper, J.C. Sferra, P.R. (1995). *J. Industrial Microbiology*. **14**, 10-16.
- Braker, G., Fesefeldt, A., Witzel, K.-P. (1998). Develoment of PCR primer system for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied Environ. Microbiol.* **64**, 3769-3775.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, Liyou., Devol, A. H., Tiedje, J. M.. (2000). Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest sedimend communities. *Applied Environ. Microbiol.* **66**, 2096-2104.

- Carlson, C. A., Pierson, L. S., Rosen, J. J., Ingraham, J. L. (1983). *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J. Bacteriol.* **153**, 93-99.
- Cervantes, F., Carrillo, Pérez J., Gómez, J.(2000). Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **42**, 73-82
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E. Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995). *Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 711-745
- Coyle, C. L., Zumft, W. G., Kroneck, P.M.H., Körmer, H., Jacob, W. (1985). Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*: purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur. J. Biochem.* **153**, 459-467.
- Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averril, B. A., Tiedje, J. M. (1989). Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd₁ and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacterias. *Applied Environ. Microbiol.* **55**, 2924-2931.
- Coyne, M. S., Arunakumari, A., Pankratz, H. S., Tiedje, J. M. (1989). Localization of cytochrome cd₁ and copper nitrite reductase in denitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 2558-2562.
- Cheesman, M. R., Ferguson, S. J., Moir, J. W. B., Richardson, D. J., Zumft, W.G., Thomson, A. J. (1997). Two Enzymes with a common function but different heme ligands in the forms as isolated. Optical and Magnetic Properties of heme groups in the oxidized forms of nitrite reductase, cytochrome cd₁, from *Pseudomonas stutzeri* and *Thiosphaera pantotropha*. *Biochemistry.* **36**, 16267-16276.
- Choi, E., Rim, J.M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methano producers in anaerobic treatment. *Water Sci. Technol.* **23**, 1259
- Chung, Y.-C., Huang, C., Li, C.-F. (1997). Removal characteristics of H₂S by *Thiobacillus* CH3 biofilter in autotrophic and mixotrophic environments. *J. Environ. Sci. Health.* **A32**(5), 1435-1450.

- Cochran, W. G. (1950) Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". *Biometrics* **6**, 105-116
- Davin Regli, A., Abed, Y., Charrel, R. N., Bollet, C., de Micco, P. (1995). Variations in DNA concentrations significantly alter the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.* **146**, 561-568.
- De Boer, A. P. N. Reijnders, W.N. M., Kuenen, J. G., Sthothamer, A. H., Van Spanning, R. J. M. (1994). Isolation, sequencing and mutational analysis of a gen cluster involved in nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **66**, 111-127.
- de la Cruz, I., Davies, I. (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* **8**, 128-133.
- Delbéz, C., Moletta, R., Godon, J.-J. (2001). Bacterial and archeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology.* **35**, 19-26.
- Delwiche, C:C., Bryan. (1976). Denitification. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 241-262.
- Denariáz, G., Payne, W. J., LeGall, J. (1991). The denitrifying nitrite reductase of *Bacillus holodenitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1056**, 225-232.
- Deppenmeier, U., Blaut, M., Mahlmann, A., Gottschalk, G. (1990). Reduced coenzyme F₄₂₀ : heterodisulfide oxido reductase, a proton – translocating redox system in methanogenic bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **87**, 9449-9453.
- Deppenmeier, U., Blaut, M. and Gottschalk, G. (1991). H₂: heterodisulfide oxidoreductase, a second energy-conserving system in the methnogenic strain Gö1. *Arch Microbiol.* **155**, 272-277.
- Doddema, H.J. and Vogels, G.D. (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 752-754
- Dolfing, J. and Mulder, J. W. (1985). Comparison of methane production rate and coenzyme F₄₂₀ content of methanogenic conmsortia in anaerobic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1142-1145.

- Elferink, S.J.W.H., Lis, R., Heilig, H.G.H.J., Akkermans, A.D.L., & Stams, A.J.M. (1998). Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Biodegradation* **9**, 169-177.
- Ellermann, J., Hedderich, R., Böcher, R., Thauer, R. K. (1988). The final step in methane formation: investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from methanobacterium. *Eur. J. Biochem.* **172**, 669-677.
- Erlanson, K., Batt, C. A. (1997). Strain-specific differentiation of Lactococci in mixed starter culture populations using randomly amplified polymorphic DNA-derived probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2702-2707.
- Escalante-Semerena, J. C., Rinehart, K. L., Wolfe, R.S. (1984). Tetrahydromethanopterin, a carbon carrier in methanogenesis. *J. Biol. Chem.* **259**, 9447-9455.
- Ferguson, S. J. (1994). Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**, 89-110
- Fernández, A., Huang, S., Cestón, S., O'Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., and Tiedje, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Applied Environmental Microbiology.* **65**, 3697-3704
- Fernández, F. J. (1997). Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Ferré, F., Marchese, A., Pezzoli, P., Griffi, S., Buxton, E., Boyer, V. (1994) Quantitative PCR: an overview. In: Mullis K.B., Ferré, F., and Gibbs, R.A. (eds) the polymerase chain reaction. Brinkhauser Boston.
- Ferry, J. G. (1993). Methanogenesis. Ecology, physiology & genetics. Chapman & Hall. New York, USA. Pp.360-365
- Ferry, J. G. (1994). Methanogenesis. Ecology, physiology & genetics. Chapman & Hall. New York, USA. Pp. 566
- Fisher, R., Thauer, R.K. (1989). Methyltetrahydromethanopterin as an intermediate in methanogenesis from acetate in *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol.* **151**, 459-465
- Gamble, T. N., Betlach, M.R., Tiedje. (1977) Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Applied Environ. Microbiol.* **33**, 926-939.

- Glasel, J. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm / 280 nm absorbance ratios. *Bio Techniques*. **18**, 62-63
- Glockner, A. B., Jüngst, A., Zumft, W. G. (1993). Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in mutationally cytochrome cd¹-free background (*nirS*⁻) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* **160**, 18-26
- Gorris, L.G.M., van der Drift, C. (1994). Cofactor contents of methanogenic bacteria reviewed. *BioFactors* **4**, 139-145.
- Grotenhuis, J. T. C., Smit, M., Plugge, C. M., Xu, Y., van Lammeren, A. A. M., Stams, A. J. M., Zehnder, A. J. B. (1991). Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1942-1949.
- Gudat, J. C., Singh, J., Wharton, D. C. (1973). Cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and some properties. *Biochim Biophys. Acta* **292**, 376-390.
- Hallin, S. and Lindgren, P.-R. (1999). PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied Environ. Microbiol.* **65**, 1652-1657.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hanaki, K. and Polprasert, C. (1989). Contribution of methanogenesis to denitrification with an upflow filter. *J. Water pollut. Control Fed.* **61**(9),1604-1611.
- Hausner, M., Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3710- 3713.
- Hendriksen, H V. and Ahring, B. K. (1996). Combined removal of nitrate and carbon in granular sludge: substrate competition and activities. *Antonie van Leeuwenhoek.* **69**, 33-39.
- Hochstein, L: I., TomLinson, T. A. (1988). The enzymes associated with denitrification. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 231-261

- Holmes, D. S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Horio, T. (1958) Terminal oxidation system in bacteria. *J. Biochem.* **45**, 195-205.
- Huynh, B. H., Lui, M.C., Moura, I., Ljungdahl, P. O., Munck, E., Pyne, W. J., Peck, H.D. DerVartanian, D. V., LeGall, J. (1982) Mossbauer and EPR studies on the nitrite reductase from *Thiobacillus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **257**, 9576-9581.
- Inanatomy, K.-I., Hochstein, L. I. (1996) The purification and properties of a copper nitrite reductase from *Haloferax denitrificans*. *Curr. Microbiol.* **32**, 72-76.
- Iwasaki, H., Matsubara, T. (1971). Cytochrome cd of *Alcaligenes faecalis*. *J. Biochem.* **69**, 847-857.
- Iwasaki, H., Matsubara, T. (1972). A nitrite reductase from *Achromobacter cycloclaste*. *J. Biochem.* **71**, 645-652
- Jetten, M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L., de Vries, S., van Loosdrecht Keunen, J. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**, 75-93.
- Juez, G., Rodríguez – Valera, F., Ventosa, A., Kushner, D. J. (1986). *Holoarcularia hispanica* spec. nov. and *Haloferax gibbonsii* spec. nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. *Syst Appl. Microbiol.* **8**, 75-79.
- Kakutani, T., Watanabe, H., Arima, K., Beppu, T. (1981). Purification and properties of a copper containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* strain S6. *J. Biochem.* **89**, 453-461.
- Kiene, R. P. (1990) Dimethyl sulfide production from dimethylsulfoniopropionate in coastal seawater samples and bacterial cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3292-3297
- Kim, K. R., Craig, H. (1993) Nitrogen-15 and oxygen-18 characteristics of nitrous oxide: a global perspective. *Science* **262**, 1855-1857.
- Klenk, H.-P., Clayton, R.A., Tomb, J.-F. and 48 other authors (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**, 364-370.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews* **43**, (1) 43-70

- Lam. Y. Nicholas, D. J. D. (1969) a nitrite reductase with cytochrome oxidase activity from *Micrococcus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **180**, 459-472.
- Laws, E. A.(1993). Aquatic pollution – an introductory text. Interscience, U.S.A. pp 55
- Lleó, M.,Tafi, M.,Signoretto, C., Cero, C., Canepari, P., (1999). Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS Microbiology Ecology* **30**,345-353.
- Lorenz, M. G., Sikorski, J. (2000). The potential for intraspecific horizontal gene exchange by natural genetic transformation: sexual isolation among genomovars of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology* **146**, 3081-3090.
- Maillacheruvu, K., Parkin, G. (1996). Kinetics of growth, substrate utilization and sulfide toxicity for propionate, acetate, and hydrogen utilizers in anaerobic system. *Water Env. Research.* **68**:(7), 1099-1106.
- Manchester, K. L.(1995) Value of A 260/280 ratios for measurement of purity of nucleic acids.*Bio Techniques.* **19**, 208-219
- Mancinelli, R. L., Cronin, S., Hochstein, L.I. (1986). The purification and properties of a cd- cytochrome nitrite reductase from *Paracoccus holodenitrificans*. *Arch. Microbiol.* **145**, 202-208.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambroock, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Mendoza, S. L. (2004). Seguimiento de bacterias metanógenas durante la aclimatación de un lodo anaerobio mesófilo a condición termofilia. Tesis. Maestría en ciencias (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Michalski, W., Nicholas, D. J. D. (1985). Molecular characterisation of a copper containing nitrite reductase from *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma s.p. *denitrificans*. *Biochim. Biophys Acta.* **828**, 130-137.
- Michotey, V., Méjean V., Bonin P. (2000). Comparison of methods for quantification of cytochrome cd₁-denitrifying bacteria in environmental marine muestras. *Applied Environ. Microbiol.* **66**, 1564-1571.

- Miller, D. J., Wood, P.M. (1983). The soluble cytochrome oxidase of *Nitrosomonas europaea*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1645-1650.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., Ghiorse W. C. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4715- 4723.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics (pp. 352-355). Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Moir, J. W. B., Baratta, D., Richardson, D. J., Ferguson, S. J. (1993). The purification of a cd₁-type nitrite reductase from the aerobic denitrifier *Thiosphaera pantotropha*: the role of pseudoazurin as an electron donor. *Eur J. Biochem.* **212**, 377-385.
- Müller, M. M., Sundman, V., Skujins, J. (1980). Denitrification in low pH spodosols and peats determined with the acetylene inhibition method. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 235-239.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A. G. (1993). Applied Environ. Microbiol. **59**, 695-700.
- Myers, R. M., Maniatis, T. Lerman, L. S. (1987). *Methods Enzimology.* **155**, 501-527
- Nogales, B., Timmis, K. N., Nedwell D. B. y Osborn A. M. (2002). Detection and diversity of expressed denitrification genes in eustarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and Environ. Microbiol.* **68**, 5017-5025.
- Newton, N. (1969) The two haem nitrite reductase of *Micrococcus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **18**,:316-331.
- O' Brien, W., Paoletti, L. C., Blakemore R. P. (1987). Spectral analysis of cytochromes in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Curr. Microbiol.* **15**, 121-127.
- Oh, S. E., Kim, K. S., Cho, J., and Kim, I.S. (2000) .Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulfur bacteria. *Water Science and Technology* **42**, (3-4) 59-68

- Otte, S., Grobbsen, G. N. Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J. C. (1996). Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2421-2426.
- Peinemann, S., Hedderich, R., Blaut, M., Thauer, R. K., Gottschalk, G. (1990). ATP synthesis coupled to electron transfer from H₂ to the heterodisulfide of 2-mercaptoheptanoylthreonine phosphate in vesicle preparations of the methanogenic bacterium strain Gö1. *FEBS Lett.* **263**, 57-60
- Pérez, T. J. (1998). Estudio y Evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis. Maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Mexico
- Prakasam, T. B. S., Loehr, R. C. (1972). Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes. *Water Res.* **6**, 859-869.
- Reyes, R. J. (2000). Eliminación biológica simultanea de nitrógeno, carbono y azufre por desnitrificación. Tesis. Maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México
- Rigby, P. W. J., Dieckman, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251.
- Rivera, R., Rodríguez, G., Razo, E., Bremauntz P. (1993). Algunos aspectos acerca del proceso de digestión anaerobia, parte 1: Microbiología. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **35**, 451-458.
- Rushbrook, E. Jr., Urban, A. R. (1998). Alook at lagoons. New Ammonia limits. *Water Env. & Tech.* **10**: (1), 34-38
- Rodríguez, G., Rivera, R., Razo, E., Bremauntz P. (1993). Algunos aspectos acerca del proceso de digestión anerobia, parte II: Bioquímica de la metanogénesis. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **35**, 459-468
- Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D. J. (1983). *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carhydrate- utilizing extreme halophile. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 369-381.

- Sambrook, J. Russel, D.W. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory press. Vol 3.
- Satoh, T. (1981). Soluble dissimilatory nitrate reductase containing cytochrome c from a photodenitrifier, *Rhodospirillum rubrum* forma sp. *denitrificans*. *Plant Cell Physiol.* **22**, 443-452.
- Sawada, E., Satoh, T., Kitmura, M. (1978). Purification and properties of a dissimilatory nitrite reductase of a denitrifying phototrophic bacterium. *Plant Cell Physiol.* **19**, 1339-1351.
- Sawhney, V., Nicholas, D. J. D. (1978) sulfide linked nitrite reductase from *Thiobacillus denitrificans* with cytochrome oxidase activity: purification and properties. *J. Gen Microbiol.* **106**, 119-128.
- SEMARNAP (1997). Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales e aguas y bienes nacionales. *Diario Oficial de la federación*. Enero, 1997.
- Schmidt, J. E., and Ahring, B. K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. (1996). *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 229-246.
- Schneegurt, M. A. Kulpa, C.F. (1998). The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* **27**, 73-79.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H., Nakamura, K. (1998). Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology.* **144**, 2655-2665.
- Shapleigh, J.P., Payne, W.J. (1985). Differentiation of *cd₁* cytochrome and copper nitrite reductase production in denitrifiers. *FEMS Lett.* **26**, 275-279.
- Siddiqui, R.A., Warneke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S., and Friedrich, B. (1993) Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **175**, 5867-5876.

- Sikorski, J., Teschner, N., Wackernagel W. (2002). Highly different levels of natural transformation are associated with genomic subgroups within a local population of *Pseudomonas stutzeri* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 865-873.
- Sparling, R., Blaut, M. Gottschalk, G. (1993). Bioenergetic studies of *Methanosphaera stadtmanae*, an obligate H₂-methanol utilising methanogen. *Can. J. Microbiol.* **39**, 742-748.
- Sublette, K. L., and Sylvester, N.D. (1987). Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: desulfurization of natural gas. *Biotechnology and Bioengineering.* **29**, 249-257.
- Suzuki, M. T., Giovannoni, S. J. (1996) *Applied Environ. Microbiol.* **62**, 625-630.
- Takashina, T., Hamamoto, T., Otozai, K., Grant, W.D., and Horikoshi.(1990). *Haloarcula japonica* sp. Nov. , a new triangular halophilic archaeobacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**, 177-181.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**, 100-180.
- Thauer, R.K., Hedderich, R., Fischer, R. (1993). Biochemistry. Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂. In *Methanogenesis*, pp. 209-252. **Edited** by J.G. Ferry. New York & London: Chapman & Hall.
- Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology.* **144**, 2377-2406.
- Thozolan , J. L., Samain, E., Grivet, J.P., Moletta, R., douborguier, H.C., Albagnac, G. (1988). Reductive carboxylation of propionate to butyrate in methanogenic ecosystems. *Applied. Environ. Microbiol.* **54**, 441-445.
- Till, B. A., Weathers, L. J., Alvarez P. J. J. (1998). Fe (0)-supported autotrophic denitrification. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 634-639.
- Timmer, A.,- Ten Hoor. (1981). Cell yield and bioenergetics of *Thiomicrospira denitrificans* compared with *Thiobacillus denitrificans*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **47**, 231-243.

- Tomlinson, G. A., Jahnke, L. L., Hochstein, L. I. (1986). *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. *Int J. Syst. Bacteriol.* **36**, 66-70.
- Van Cleemput, O., Patrick, W. H. (1974). Nitrate and nitrite reduction in flooded gamma-irradiated soil under controlled pH and redox potential conditions. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 85-88.
- Van der Oost, J., De Boer, A.P.N., Gier, J. W. L., Zumft, W. G., Stouthamer, A. H., Van Spanning, R. J. M., (1994) the heme copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *Fems Microbiol. Lett.* **121**, 1-10
- Visser, J.M., Robertson, L.A., Van Verseveld, H.W., Kuenen G. (1997). Sulfur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology.* **63**, 2300-2305.
- Vorholt, J. A., Hafenbradl, D., Stetter, K. O. Thauer, R. K. (1997). Pathways of autotrophic CO₂ fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N₂O in *Ferroglobus placidus*. *Arch. Microbiol.* **167**, 19-23.
- Warburg, O., Christian, W. (1942). Isolierung and kristallisation desgärungsferments enolase. *Biochem . 2.* **310**, 384-421
- Werber, M. M., and Mevarech, M.(1978). Induction of dissimilatory reduction pathway of nitrate in *Halobacterium* of the Dead Sea. *Arch. Biochem. Biophys.* **186**, 60-65.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L., Boone, D. R. (1992). The methanogenic bacteria. In Balows, A., Trüper., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds) *The Prokariotes*. 2nd edn. Springer- Verlag, New York. Pp 719-767.
- Widdel, F. (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1056-1062.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., Chomczynski. P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assesment of nucleic acid purity. *Bio Techniques.* **22**, 474-481.

- Williams, J. G.K., Kubelik, A.R., Livak, K. J., Rafalski, J.A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. **18**, 6531-6535
- Wilson, I. G. (1997). *Applied Environ. Microbiol.* **63**., 3741-3751.
- Woese, C: R: (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271
- Yamazaki, T., Oyanagi, H., Fujiwara. T., Fukumori, Y. (1995). Nitrite reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*: a novel cytochrome cd1 with Fe(II): nitrite oxidoreductase activity. *Eur. J. Biochem.* **23**, 665-671.
- Ye, R.W., Averill, A., Tiedje, J.M. (1994). Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1053-1058.
- Ye, R.W., Fries, M. R., Bezborodnikov, S.G., Averill, B. A., Tiedje J. M. (1993). Characterization of the structural gene encoding a copper-containing nitrite reductase and homology of this gen to DNA of other denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**,250-254.
- Zumft, W. G., Gotzman, D. J., Kroneck., P.M.H. (1987) Type I blue copper proteins constitute a respiratory nitrite reducing system in *Pseudomonas aureofaciens*. *Eur J. biochem.* **168**, 301-307.
- Zumft, W. G., Döhler, K., Körner, H., Löchelt, S. Viebrock, A., Frunzke, K. (1988). Defects in cytochrome cd₁-dependent nitrite respiration of transposon Tn5-induced mutants from *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* **149**, 492-498.
- Zumft, W. G. (1992). The Denitrifying Prokaryotes: in Balows (ed.) The prokaryotes. Vol. I. Springer-Verlag
- Zumft, W.G. (1993). The biological rol of nitric oxide in bacteria. *Arch. Microbiol.* **160**, 253-254.
- Zumft, W.G., Braun, C., Cuypers, H. (1994). Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. Primary structure and gene organisation of a novel bacterial cytochrome bc complex. *Eur. J. Biochem.* **219**, 481-490.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **61**, 533-616.

ANEXO A

ADN de esperma de salmón: Se disuelve 1 g de ADN de esperma de salmón tipo III (Sigma Chemical Co.) en 50 ml de NaOH 0.3N, agitando durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se calienta la solución a 80°C durante dos horas para disminuir su viscosidad y se añaden 0.5M de tris-HCl pH 8.0, 1 ml de EDTA 0.5M pH 8.0 y 50 ml de TE y se ajusta el pH a 7 con HCl concentrado. Se fenoliza y precipita en etanol enfriado a - 20°C. Se centrifuga y se resuspende en el volumen de TE necesario para conseguir una concentración final de ADN de 10mg/mL

Amortiguador de hibridación I: Denhardt's 1x, formamida al 40% (v/v), Glicina al 1% (p/v), SSC 5x y amortiguador de fosfato sódico 50 mM pH 6.5

Amortiguador de lavado I: SDS al 0.1% (p/v) y SSC 2x

Amortiguador de lavado II: SDS al 0.1% (p/v) y SSC 0.1x

Amortiguador de marcaje 10x: DTT 5mM. Gelatina 500µg/ml, MgCl₂ 50 mM y tris-HCl 0.5M pH 8.0

Amortiguador de ruptura I.- EDTA 100 mM pH 8.0, SDS al 1% (p/v) y Tris - HCl 0.2 M. se ajusta el pH a 8.2 con HCl

Amortiguador de transferencia SSC 10x: El amortiguador SSC 20x esta compuesto por citrato trisódico 0.3 M y NaCl 3M. El pH se ajusta a 7 con NaOH

Denhardt's 100x: BSA al 2%(p/v), ficoll al 2% (p/v) y polivinilpirrolidona al 2% (p/v). Se disuelve en este orden en agua estéril sin calentar. Se almacena en alícuotas a -20 ó -70°C.

Fenol neutro.- Se mezclan con agitación 4 vol. de fenol ácido con un vol. de Tris - HCl 1 M pH 8. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase acuosa de la fenólica. El fenol así preparado se conserva a 4 °C en un recipiente opaco, manteniéndose durante un mes. El fenol ácido se prepara mezclando 500 ml de fenol

sólido con 500 ml de agua destilada, se agita y se deja reposar y se retira la fase superior acuosa.

CIA: Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

Fenol- CIA.- se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y CIA

Mezcla de enzimas: ADNasa I (0.5pg/μl) y ADN polimerasa I (0.025(U/μl))

Solución desnaturizante: NaC 1.5M y NaOH 0.5M

Solución neutralizante: NaCl 3M y Tris-HCl 1M pH 7.5

STET: EDTA 50 mM pH 8.0, sacarosa al 8% (p/v), Tris-HCl 10mM pH 8.0 y tritón X-100 al 0.5%

Tampones QX1 y PE: Se desconoce la composición de estas dos soluciones, puesto que no es aportada por el fabricante

TE (Tris -HCl/ EDTA).- EDTA 1 mM pH 8.0, Tris-HCl 10 mM pH 8.0

TEN (Tris / EDTA/ NaCl).- A 930 ml de agua se le adiciona 6.06g de tris base + 0.37 g Na₂EDTA + 8.77 g NaCl. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl

Anexo B

Medio Luria-Bertani (LB): medio de cultivo para *E. coli*. (Miller , 1972).

Bacto-triptona	10g
NaCl	10g
Extracto de levadura	5g

El pH se ajusta a 7.5 con NaOH y se añade agua destilada hasta 1 litro. Se esteriliza durante 20 min a 120 °C

Medio LA: es el medio LB utilizado como medio sólido. Se adiciona 20 g/L de agar. Se esteriliza durante 20 min. a 120 °C.

Medio TB (Maniatis y col., 1982): Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli* , con el fin de obtener ADN plasmídico.

Extracto de levadura	24 g
Bacto-triptona	12g
Glicerol	4 ml

Se añade agua destilada hasta 900 ml y se esteriliza en autoclave. Después se adicionan 100 ml de una solución estéril de KH_2PO_4 170mM y K_2HPO_4 720mM.

ANEXO C

SECUENCIA DEL CLON 11

```

1 AGCTATGCAT CCAACGCGTT GGGAGCTCTC CCATATGGTC GACCTGCAGG CGGCCGCGAA
61 TTCACTAGTG ATTGCGGAAT TCCGTTGAAC TTGCCGGTCG GCGTAACGAC GGCCGGGTCTG
121 GTGATGACCT TCTTCACCTT GAGCGTCTTG TCGTCGTAGA TCACGATGGC CGACTGGTCTG
181 GTCTTGCCGC CCCACAGCGA GATCCAGACT TCGTCGCCTG CCTCGTTGTA CTCAGGCTGC
241 ACGGCACGAC GGATCGCCTT GCTTTCGGGC AGACCCGAAT CCTTGGCGAC GTCGAGACGC
301 ACCGGCTCCT TCTTCAGGTC GGCCTTGTCG AACACGAAGA CAGCTTCGGC AATCTCACGC
361 TCGGGGTCA TCGGCGCGTC AGCCAGAAG TTCTTGGACT TCGGATGGGT CTTACGAAC
421 AGGTTGCCGG CACCCGGCAT CTTCAGCTCC TGAACGACCT TCCAGTTGTG ATCCTTGTGC
481 TTGGCGAACT TGGGATCGTC GGAAGCAGTG GAGATCAGCG ACACGACATC GTCACCCAGG
541 TGACCAGTCG ACCACACGGG ACCAAACTCC GGATGGACGA AGTTGGCACC ACGGCCCGGG
601 TGCGGGATCT TGGCGGTATC GACCAGAGCG GCGAGCTTGC CGGTCTTGGT GTCGACCGCT
661 GCAACCTTGT TGGGCGCGTT CGCGGCAACC ATGAAGTAGC GGCCCGAGGC ATCCAACCG
721 CCGTCATGCA GGAACCTGGC CGATTTCGATG GNGGTGGTCT TCAGGTTCTT GATGTCGCTG
781 TANTCCACCA GCAGGATCAT GCCGGTTTCC TTGACGTTCA CCACCCACTC AGGCTTCTGG
841 AGCGAGGCCA CGATGGAGGC CACACGCGGC TCGGGGTGGT AGAATTCTAT AATCGAATTC
901 CCGCGGCCGC CATGGCGGCC GGGAGCATGC GACGTCGGGC CCAA

```


ANEXO D

SECUENCIA DEL CLON 16

```

1 TTTTCAAGAC TATGCCATCC AACGCGTTGG GAGCTCTCCC ATATGGTACG ACCTGCAGGC
61 GGCCGCGAAT TCACTAGTGA TTGCGGAATT CCGTTGAACT TGCCGGTCGG CGTAACGACG
121 GCCGGGTCGG TGATGACCTT CTTCACCTTG AGCGTCTTGT CGTCGTAGAT CACGATGGCC
181 GACTGGTCGG TCTTGCCGCC CCACAGCGAG ATCCAGACTT CGTCGCCTGC CTCGTTGTAC
241 TCAGGCTGCA CGGCACGACG GATCGCCTTG CTTTCGGGCA GACCCGAATC CTTGGCGACG
301 TCGAGACGCA CCGGCTCCTT CTTCAGGTCG GCCTTGTCGA ACACGAAGAC AGCTTCGGCA
361 ATCTCACGCT CGGGGTTTCAT CGGCGCGTCA GCCCAGAAGT TCTTGGACTT CGGATGGGTC
421 TTCACGAACA GGTGCGCGC ACCCGGCATC TTCAGCTCCT GAACGACCTT CCAGTTGTGA
481 TCCTTGCTGCT TGGCGAACTT GGGATCGTCG GAAGCAGTGG AGATCAGCGA CACGACATCG
541 TCACCCAGGT GACCAGTCGG CCACACGGGA CCAAAC TCCG GATGGACGAA GTTGGCACCA
601 CGGCCCGGGT GCGGGATCTT GCGGGTATCG ACCAGAGCGG CGAGCTTGCC GGTCTGGTG
661 TCGACCCTG CAACCTTGTT GGACGCGTTC GCGGCAACCA TGAAGTAGCG GCCCGAGGCA
721 TCCCAACCGC CGTCATGCAG GAACTTGGCC GATTCGATGG GGGGGTCTT CAGGTTCTTG
781 ATGTCGCTGT AGTCCACCAG CAGGATCATG CCGGTTTCCT TGACGTTTAC CACCCACTCA
841 GGCTTCTGGA GCGAGGCCAC GATGGAGGCC ACACGCGGCT CGGGGTGGTA GAATTCTATA
901 ATCGAATTCC CGCGGCCGCA TGGCGGGCGG GAGCATGCGA CGTCGGGC

```

ANEXO E

SECUENCIA DEL CLON 32

```

1  TTAGCTATGC ATCCAACGCG TTGGGAGCTC TCCCATATGG TCGACCTGCA GCGGCCGCG
61  AATTCAC TAG  TGATTGCGGA ATTCCGTTGA ACTTACCGGT CGGCGTAAAG ACGGCCGGGT
121 CGGTGATGAC CTTCTTCACC TTGAGCGTCT TGTCGTCGTA GATCACGATG GCCGACTGGT
181 CGGTCTTGCC GCCCCACAGC GAGATCCAGA CTTTCGTCGCC TGCCTCGTTG TACTCAGGCT
241 GCACGGCACG ACGGATCGCC TTGCTTTCGG GCAGACCCGA ATCCTTGGCG ACGTCGAGAC
301 GCACCGGCTC CTTCTTCAGG TCGGCCTTGT CGAACACGAA GACAGCTTCG GCAATCTCAC
361 GCTCGGGGTT CATCGGCGCG TCAGCCAGA AGTTCTTGA CTTCCGATGG GTCTTCACGA
421 ACAGGTTGCC GGCACCCGGC ATCTTCAGCT CCTGAACGAC CTTCCAGTTG TGATCCTTGT
481 GCTTGGCGAA CTTGGGATCG TCGGAAGCAG TGGAGATCAG CGACACGACA TCGTCACCCA
541 GGTGACCAGT CGACCACACG GGACCAAACCT CCGGATGGAC GAAGTTGGCA CCACGGCCCG
601 GGTGCGGGAT CTTGGCGGTA TCGACCAGAG CGGCGAGCTT GCCGGTCTTG GTGTCGACCG
661 CTGCAACCTT GTTGACGCG TTCGCGGCAA CCATGAAGTA GCGGCCGAG GCATCCCAAC
721 CGCCGTCATG CAGGAACTTG GCCGATTCTGA TGGTGGTGGT CTTTCAGGTTT TTGATGTCGC
781 TGTAGTCCAC CANCAGGATC ATGCCGGTTT CCTTGACGTT CACCACCAC TCAGGCTTCT
841 GGAGCGAGGC CACGATGGAG GCACACGCGG TTCCGGGTGG TAGAATCTA TAATCGAATT
901 CCCGCGGCCG CCATGGCGGC CGGGAGCATG CGACGTCGGG CCCAA

```

ANEXO F

PRUEBA BLAST: SECUENCIA DEL GEN nirS

Distribution of 137 Blast Hits on the Query Sequence

Sequences producing significant alignments:				Score	E	
				(bits)	Value	
gi	46981103	emb	AJ626831.1	Marinobacter sp. NBC31 partial ...	1199	0.0
gi	19548104	gb	AY078257.1	Thauera aromatica strain T1 puta...	1043	0.0
gi	19548102	gb	AY078256.1	Thauera aromatica strain K172 pu...	1019	0.0
gi	19548108	gb	AY078259.1	Thauera aromatica strain 3CB3 pu...	987	0.0
gi	19548136	gb	AY078273.1	Acidovorax sp. 2FB7 putative dis...	985	0.0
gi	19548114	gb	AY078262.1	Thauera chlorobenzoica strain 4F...	985	0.0
gi	19548116	gb	AY078263.1	Thauera chlorobenzoica strain 4F...	977	0.0
gi	19548112	gb	AY078261.1	Thauera chlorobenzoica strain 3C...	977	0.0
gi	19548106	gb	AY078258.1	Thauera aromatica strain 3CB2 pu...	955	0.0
gi	19548118	gb	AY078264.1	Thauera selenatis putative dissi...	827	0.0
gi	19548122	gb	AY078266.1	Thauera terpenica strain 58Eu pu...	803	0.0
gi	19548124	gb	AY078267.1	Thauera terpenica strain 21Mol p...	763	0.0
gi	45838	emb	X56813.1	PSNIRSTB P.stutzeri nirS, nirT, nirB,...	628	e-177
gi	22796205	emb	AJ248396.2	GPR248396 Gamma proteobacterium ...	589	e-165
gi	22796211	emb	AJ248399.2	GPR248399 Gamma proteobacterium ...	581	e-162
gi	22796209	emb	AJ248398.2	GPR248398 Gamma proteobacterium ...	581	e-162
gi	22796197	emb	AJ248392.2	GPR248392 Gamma proteobacterium ...	579	e-162
gi	22796207	emb	AJ248397.2	GPR248397 Gamma proteobacterium ...	565	e-158
gi	22796213	emb	AJ248400.2	GPR248400 Gamma proteobacterium ...	563	e-157
gi	3757738	emb	AJ224913.1	AFA224913 Alcaligenes faecalis Al...	559	e-156
gi	151375	gb	M80653.1	PSENADHS Pseudomonas stutzeri nitrite...	521	e-145
gi	19548120	gb	AY078265.1	Thauera linaloolentis putative d...	519	e-144
gi	3758912	emb	AJ224910.1	DIS224910 Unidentified bacteria d...	426	e-116
gi	19548128	gb	AY078269.1	Azoarcus evansii putative dissim...	305	9e-80
gi	46917311	dbj	AB118896.1	gamma proteobacterium R1-Dec-MI...	303	3e-79
gi	19548110	gb	AY078260.1	Thauera aromatica strain AR1 put...	278	2e-71
gi	19548130	gb	AY078270.1	Azoarcus toluvorans putative dis...	212	1e-51
gi	46917309	dbj	AB118895.1	gamma proteobacterium R1-Apr-MI...	208	2e-50
gi	18087049	gb	AF335922.1	AF335922 Arthrobacter sp. N6 NirS...	161	3e-36
gi	46367637	emb	AJ508907.1	SFR508907 Spodoptera frugiperda ...	149	1e-32
gi	45597246	dbj	AB120384.1	Equus caballus Ly49B mRNA for k...	149	1e-32
gi	31074767	emb	AJ488180.1	SFR488180 Spodoptera frugiperda ...	149	1e-32
gi	23304621	emb	AJ508061.1	SFR508061 Spodoptera frugiperda ...	149	1e-32
gi	27497478	emb	AJ535884.1	CAR535884 Cicer arietinum Tyl-co...	147	5e-32
gi	5566581	emb	AJ244005.1	LDO244005 Lepilemur dorsalis geno...	147	5e-32
gi	32129009	gb	BT009458.1	Triticum aestivum clone wlsu2.pk...	145	2e-31
gi	37724089	gb	AY158071.1	Petrosia ficiformis silicatein m...	145	2e-31
gi	17148529	emb	AJ420894.1	ECY420894 Entandrophragma cylind...	145	2e-31
gi	17148528	emb	AJ420893.1	ECY420893 Entandrophragma cylind...	145	2e-31

gi	17148520	emb	AJ420885.1	ECY420885	Entandrophragma cylind...	145	2e-31
gi	12053787	emb	AJ271637.1	EGU271637	Elaeis guineensis micr...	145	2e-31
gi	5566582	emb	AJ244006.1	LDO244006	Lepilemur dorsalis geno...	145	2e-31
gi	45655413	gb	AY508734.1		Cloning vector psiLentGene Hygro...	143	7e-31
gi	45655412	gb	AY508733.1		Cloning vector psiLentGene Neomy...	143	7e-31
gi	45655411	gb	AY508732.1		Cloning vector psiLentGene Purom...	143	7e-31
gi	45655410	gb	AY508731.1		Cloning vector psiLentGene Basic...	143	7e-31
gi	21213881	emb	AJ458311.1	CNU458311	Cocos nucifera micros...	139	1e-29
gi	17148527	emb	AJ420892.1	ECY420892	Entandrophragma cylind...	139	1e-29
gi	33186703	emb	AJ496411.1	ACA496411	Antrodia camphorata pa...	137	5e-29
gi	18087050	gb	AF335923.1	AF335923	Staphylococcus sp. N23 N...	137	5e-29
gi	11992867	gb	AY013652.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	131	3e-27
gi	11992787	gb	AY013616.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	131	3e-27
gi	17148525	emb	AJ420890.1	ECY420890	Entandrophragma cylind...	129	1e-26
gi	17148522	emb	AJ420887.1	ECY420887	Entandrophragma cylind...	129	1e-26
gi	46020006	emb	AJ310811.2	OOS310811	Ostertagia ostertagi m...	127	4e-26
gi	11992783	gb	AY013612.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	127	4e-26
gi	39753896	gb	AY425132.1		Vantanea guianensis PHYC (PHYC) ...	127	4e-26
gi	27777700	gb	AF439746.3		Talaromyces emersonii beta-xylos...	123	7e-25
gi	11992868	gb	AY013653.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	121	3e-24
gi	24021286	gb	AF541918.1		Cucumber mosaic virus coat prote...	119	1e-23
gi	11992859	gb	AY013644.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	117	4e-23
gi	11992779	gb	AY013608.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	117	4e-23
gi	37693290	emb	AJ560651.1	BSP560651	Bradyrhizobium sp. ISL...	115	2e-22
gi	26005279	emb	AJ519510.1	BEX519510	Bencomia exstipulata m...	115	2e-22
gi	25136931	emb	AJ516005.1	CSI516005	Camellia sinensis RAPD...	115	2e-22
gi	17148521	emb	AJ420886.1	ECY420886	Entandrophragma cylind...	115	2e-22
gi	37951184	emb	Y14150.1	RVY14150	Rhodobacter veldkampii pa...	113	7e-22
gi	33186707	emb	AJ496413.1	ACA496413	Antrodia camphorata pa...	113	7e-22
gi	8216948	emb	X65309.2	CVGEM5ZFM	Cloning vector pGEM-5Zf(-)	113	7e-22
gi	5701825	emb	X65308.2	CVGEM5ZFP	Cloning vector pGEM-5Zf(+)	113	7e-22
gi	27524780	emb	AJ509592.1	AME509592	Apis mellifera micros...	113	7e-22
gi	11992781	gb	AY013610.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	113	7e-22
gi	11992780	gb	AY013609.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	113	7e-22
gi	14009668	gb	AF338824.1	AF338824	Cloning vector pVLH/int(...	113	7e-22
gi	6003514	gb	AF180731.1	AF180731	Klebsiella pneumoniae dih...	113	7e-22
gi	6002958	gb	AF173954.1	AF173954	Cloning vector pGEM-URA3,...	113	7e-22
gi	4322592	gb	AF092546.1	AF092546	Cloning vector pCPT8, com...	113	7e-22
gi	3093334	emb	Y17172.1	HSY17172	Homo sapiens mRNA from HIV...	113	7e-22
gi	1890618	emb	Y11454.1	SSCAREP21	S.salar microsatellite DN...	113	7e-22
gi	1890621	emb	Y11455.1	SSCARP11	S.salar microsatellite DNA...	113	7e-22
gi	14041575	emb	AJ400909.1	GCY400909	Geodia cydonium mRNA f...	113	7e-22
gi	537468	gb	U14121.1	CVU14121	Cloning vector pSG928, HIS4-...	113	7e-22
gi	7242877	dbj	AB032363.1		Homo sapiens B120ind1 mRNA, 3'UT...	113	7e-22
gi	22091596	emb	AJ489198.1	BNA489198	Beta nana Tyl-copia-li...	113	7e-22
gi	22091595	emb	AJ489197.1	BNA489197	Beta nana Tyl-copia-li...	113	7e-22
gi	20067364	emb	AJ307598.1	AOS307598	Armillaria ostoyae mic...	113	7e-22
gi	20067363	emb	AJ307597.1	AOS307597	Armillaria ostoyae mic...	113	7e-22
gi	995616	emb	X91394.1	AEDNANIRS	A.eutrophus nirS gene	111	3e-21
gi	32452853	gb	AY268947.2		Echis carinatus echicetin A-chai...	109	1e-20
gi	40949809	gb	AY461597.1		Synthetic construct arsenic-like...	109	1e-20
gi	32450775	gb	AY268948.2		Echis carinatus echicetin B-chai...	107	4e-20
gi	31414345	emb	AJ564226.1	STU564226	Solanum tuberosum, par...	107	4e-20
gi	11992866	gb	AY013651.1		Uncultured Banisveld landfill ba...	107	4e-20
gi	27848575	emb	AJ537429.1	PCO537429	Puccinia coronata var....	107	4e-20
gi	14329825	emb	AJ309392.1	ABE309392	Atropa belladonna part...	107	4e-20
gi	5566583	emb	AJ244007.1	LDO244007	Lepilemur dorsalis geno...	107	4e-20

gi 37805763 emb AJ558163.1 SST558163	Strongyloides stercora...	105	2e-19
gi 11992860 gb AY013645.1	Uncultured Banisveld landfill ba...	105	2e-19
gi 19577331 emb AJ438185.1 UAN438185	Uncultured bacterium p...	105	2e-19
gi 33145938 emb AJ496405.1 ACA496405	Antrodia camphorata pa...	103	6e-19

Alignments

>[gi|46981103](#)|[emb|AJ626831.1](#) Marinobacter sp. NBC31 partial nirS gene
 for nitrite reductase
 Length = 612

Score = 1199 bits (605), Expect = 0.0
 Identities = 608/609 (99%)
 Strand = Plus / Minus

>[gi|19548104](#)|[gb|AY078257.1](#) Thauera aromatica strain T1 putative
 dissimilatory nitrite
 reductase (nirS) gene, partial cds
 Length = 892

Score = 1043 bits (526), Expect = 0.0
 Identities = 728/796 (91%)
 Strand = Plus / Minus