

**“MICROBIOLOGÍA APLICADA A
LAS CIENCIAS AMBIENTALES:
REACTORES BIOLÓGICOS PARA EL
TRATAMIENTO DE EFLUENTES
INDUSTRIALES”**



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA

**Dayana Travers Arocena
Lic. Bioquímica**



Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales

Facultad de Ciencias / Facultad de Química

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

***“Microbiología aplicada a las ciencias ambientales:
reactores biológicos para el tratamiento de efluentes
industriales”***

Dayana S. TRAVERS AROCENA

Lic. Bioquímica

Directores de Tesis:

Dr. Rodolfo J. Menes

Dra. Claudia Etchebehere

Diciembre 2007

INDICE.....	i
Abreviaturas mas utilizadas.....	vi
Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	4
1. Descripción Y Relevancia De La Temática.....	6
1.1 Marco Legal Y Económico.....	6
1.2 Efluentes Industriales.....	10
1.2.1 Industria Láctea En Uruguay.....	10
1.2.2 Problema Ambiental.....	13
1.2.3 Sistemas De Tratamiento De Efluentes.....	17
1.2.3a Sistemas De Tratamiento Terciario Tipo SBR (Sequencing Batch Reactor).....	18
1.3 Fisiología De La Remoción De Nitrógeno.....	21
1.3.1 Ciclo Del Nitrógeno.....	21
1.3.2 Nitrificación.....	24
1.3.3 Desnitrificación.....	28
1.3.4 Vías No Clásicas.....	31
1.4 Fundamentos De La Metodología A Utilizar.....	34
1.4.1 FISH (Fluorescent In Situ Hybridization).....	35
1.4.2 Clonado Y Secuenciación.....	41
1.4.3 T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism).....	43
1.4.4 Técnicas Dependientes De Cultivo.....	49
1.4.4 A. Número Mas Probable De Bacterias Desnitrificantes.....	49
1.4.4 B. Recuento Y Aislamiento En Placa De Heterótrofos Aerobios Totales.....	50

1.4.5 Medida De Actividad Desnitrificante.....	51
1.4.6 Medida De Actividad Potencial Nitrificante Y Heterótrofa.....	52
1.5 Importancia Y Aplicaciones De Los Resultados De La Tesis.....	54
2. Objetivos.....	56
2.1 Objetivo General:.....	56
2.2 Objetivos Específicos.....	56
3. Hipótesis Y Preguntas A Responder.....	57
3.1 Hipótesis.....	57
3.2 Preguntas A Ser Respondidas.....	57
4. Materiales Y Métodos.....	58
4.1 Reactores.....	58
4.2 Medida De Actividad Potencial Nitrificante Y Heterótrofa.....	61
4.3 Medida De Sólidos Suspendidos Volátiles.....	62
4.4 Medida De Amonio Por Método De Salicilato-Hipoclorito.....	64
4.5 Medida De Actividad Desnitrificante.....	65
4.6 FISH.....	67
4.7 Aislamiento De Cepas.....	70
4.8 Método De Número Más Probable (NMP) De Bacterias Desnitrificantes.....	70
4.9 Recuento En Placa De Heterótrofos Aerobios Totales.....	71
4.10 Actividad Desnitrificante Y Heterótrofa Específica.....	71
4.11 Extracción De ADN.....	72
4.12 T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism).....	72
4.13 Clonado.....	77
5 Resultados y discusión.....	79

5.1 Capítulo 1. Reactor F.....	79
5.1.1. Actividad Respirométrica Del Reactor F.....	80
5.1.2. Actividad Desnitrificante Del Reactor F.....	92
5.1.3. Recuento Por FISH.....	94
5.1.4. Aislamiento De Cepas.....	99
5.1.5. Análisis De La Comunidad Desnitrificante:	
T-RFLP Y Clonado Del Gen nirS.....	102
5.1.6. Análisis De La Comunidad De AOB: T-RFLP Y Clonado Del Gen <i>amoA</i>	114
5.1.7. Análisis De Bacterias Totales: T-RFLP Y Clonado Del Gen ARNr 16S.....	120
Discusión Y Conclusión General Capítulo 1.....	125
5.2 Capítulo 2. Reactor M.....	134
5.2.1 Análisis De Actividad Respirométrica Y FISH.....	135
5.2.2 Aislamiento De Cepas.....	138
5.2.3 Análisis De Bacterias Totales: T-RFLP Del gen ARNr 16S.....	139
5.2.3 Análisis De Bacterias Oxidantes De Amonio (AOB):	
T-RFLP Del Gen <i>amoA</i>	143
Discusión Y Conclusión General Capítulo 2.....	144
5.3 Capitulo 3.....	147
Aplicación en el modelado de reactores SBR.....	148
5.3.1 Determinación De Sólidos Por Célula.....	148
5.3.1 Determinación De La Actividad Específica.....	149
Discusión Y Conclusión General Capítulo 3.....	153
Conclusión general.....	155
6. Referencias bibliográficas.....	160

7. Anexos.....	170
ANEXO 1: % Formamida.....	171
ANEXO 2: Tabla de número mas probable.....	177
ANEXO 3: Condiciones de amplificación por PCR.....	179
ANEXO 4: Condiciones de restricción enzimática.....	180
ANEXO 5: Normalización de datos del T-RFLP.....	183
ANEXO 6 : Efectos de la Aliltiorea (ATU) en la actividad nitrificante.....	184
ANEXO 7: T-RFLP del gen <i>amoA</i> con <i>AluI</i>	186
ANEXO 8: Medios, reactivos y buffers.....	189

ABREVIATURAS MAS UTILIZADAS

AMO: Amonio-monooxigenasa

amoA: gen de la amonio-monioxigenasa

AOB: Bacterias oxidantes de amonio

DQO: Demanda Química de Oxígeno

DQOs: Demanda Química de Oxígeno soluble

FISH: Fluorescence in situ Hybridization

HAO: Hidroxilamina oxido-reductasa

NAR: Nitrato reductasa

NIR: Nitrito reductasa

NirS y nirK : genes codificantes de la enzima NIR (NIR cd1 y NIR Cu⁺² respectivamente)

NOB: Bacterias oxidantes de nitrito

NOR: Nitrito oxidorreductasa; **NOR:** Oxido nítrico reductasa

NOS: Oxido nitroso reductasa

Nt: Nitrógeno Total

PFA: Paraformaldehído

SBR: Sequencing Batch Reactor

SST: Sólidos suspendidos totales

SSV: Sólidos suspendidos volátiles

T-RF : fragmento terminal de restricción

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

Agradecimientos

...A mi madre, mis abuelos, a Eduardo y toda mi familia por confiar en mi y apoyarme desde el principio en cada paso que doy. Porque de ellos he sacado la fuerza para no rendirme en el camino.

... a mis amigos de la vida que siempre me alientan y me acompañan sin importar cuan lejos esté.

... a mis amigos de “la barra Ma.c.a” de los cuales aprendí mucho en esta maestría y por sobre todo por todos los buenos momentos juntos, en fin por su amistad...

... a Valentina por ayudarme en estos últimos pasos de la tesis y compartir esas lindas tardes de estudio estando lejos de casa. A toda la barra nueva por estar ahí...

...a todos los “micro de química” porque es una gran familia que me dio lugar y siempre están y estarán en mi corazón. De quienes he aprendido mucho, gracias a su paciencia y “buena onda” . En especial a Lu, Patty, La morocha (Jimena), Ángela, Ana María, Silvana T, Ana F., Analía, Meche, Matilde, Mauricio, Silvana A., Silvana V., Mónica, Guadalupe, Wilson, Gianna, Gabriela L, Gabriela G., María Inés, Inés, Sonia, Sergio, Pía, Anita, Carola, Vanesa, Graciela.

Y muy pero muy especialmente a mis directores de tesis Javier y Claudia, porque siempre me dieron un lugar y me enseñaron con mucha paciencia sus conocimientos. Porque además de ser excelentes directores de tesis son excelentes personas de las cuales he aprendido mucho. Por dejarme ser aprendiz del maestro (¡!)...

...a Adrián, Soledad, Rafael, y Alejandra de la facultad de Ingeniería por cuidar a “Flora y Manolo” sin los cuales esta tesis no hubiese sido imposible

El presente trabajo de investigación fue financiado en parte por el proyecto EOLI (INCO program of the European Community (Contract number ICA4-CT-2002-10012) y por el Proyecto CSIC I+D

Agradezco a la Comisión de la Maestría en Ciencias Ambientales quienes me otorgaron la beca en el año 2005 para solventar otros gastos de la investigación

RESUMEN

El vertido directo de los efluentes industriales hacia cursos de agua puede ocasionar serios problemas ambientales como la eutrofización. Es por ello que se implementan diversos sistemas para el tratamiento de efluentes antes de ser vertidos. En este caso se estudiaron dos sistemas de tratamiento biológico constituidos cada uno por un reactor SBR (*sequencing batch reactor*) a escala de laboratorio (Reactor F y Reactor M) durante aproximadamente 650 días. Los mismos fueron diseñados para llevar a cabo la remoción de carbono y nitrógeno de efluentes de industria láctea, alternando en el mismo tanque las etapas aerobia (nitrificación) y anóxica (desnitrificación).

El análisis de la comunidad microbiana de estos reactores se abordó mediante el uso de distintas estrategias: técnicas moleculares (FISH, T-RFLP, clonado y secuenciado de los genes ARNr 16S *amoA* y *nirS*), medidas de actividad respirométrica (nitrificante y heterótrofa), de actividad desnitrificante, y técnicas clásicas de cultivo.

Las medidas de actividad respirométrica reflejaron los cambios en la eficiencia de remoción de nutrientes dentro los reactores durante la operación. Tanto la actividad nitrificante como la heterótrofa lograron recuperarse luego del agregado de tóxicos (Alitiourea y 4-clorofenol) lo cual resulta interesante para sistemas reales donde pueden ocurrir descargas de sustancias provenientes del lavado de tanques o derrames. Esta técnica sencilla podría utilizarse para el control de sistemas reales donde el monitoreo permanente es menos habitual y mas costoso.

Las herramientas moleculares utilizadas permitieron identificar las especies nitrificantes y desnitrificantes mas abundantes presentes y explicar parcialmente los cambios en la eficiencia de remoción de nutrientes. Entre las bacterias desnitrificantes mas abundantes

se encontraron presentes los géneros *Ochrobactrum*, *Thauera*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Paracoccus* y *Dechloromonas*. Mientras que las bacterias oxidantes de amonio dominantes fueron *Nitrosomonas europaea* y *Nitrospira tenuis*.

Se demostró que los cambios en la operación y algunas perturbaciones generan cambios en la estructura de la comunidad y en la diversidad microbiana, lo cual, en la mayor parte de los casos influye en la actividad y el desempeño del reactor.

Palabras clave: SBR, efluentes industriales, nitrificación, desnitrificación, respirometría, FISH, T-RFLP, ARNr 16S, *amoA*, *nirS*, diversidad microbiana.

ABSTRACT

Industrial wastewater can cause serious problems for aquatic environment such as eutrophication. That is the reason why different systems are employed for effluent treatment before throwing it to water course.

In this work, two biological treatment systems (laboratory scale) were analyzed during approximately 650 days. Each system is based on a SBR reactor (sequencing batch reactor). Both reactors (Reactor F and Reactor M) were developed in order to remove carbon and nitrogen from dairy wastewater, switching from aerobic (nitrification) and anoxic (denitrification) steps.

Different strategies have been used so as to study the reactor's microbiology: molecular techniques (FISH, T-RFLP, cloning and sequencing of 16S rRNA, *amoA* and *nirS* genes), respirometric measures (nitrification and heterotrophic activity test), denitrification activity, and culture methods.

Respirometric activity reflected the reactor's performance (nutrient removal). Both heterotrophic and nitrifying activities return to normal situation after toxic substances additions (Alylthiourea and 4-chlorophenol). Real systems can be monitored by measuring this activity.

Molecular methods allowed the identification of most predominant nitrifying and denitrifying species. They also explained changes in nutrients removal's efficiency. Denitrifying community was dominated by genus *Ochrobactrum*, *Thauera*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Paracoccus* y *Dechloromonas*. While principal ammonia oxidizing species were *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira tenuis*.

It was proved that modifications and some disturbances during operation produced changes in community structure and microbial diversity. Usually, this affects reactor's performance and microbial activity.

Keywords: SBR, industrial wastewater, nitrification, denitrification, respirometric activity, FISH, T-RFLP, 16S rRNA, *amoA*, *nirS*, microbial diversity.

1. Descripción y Relevancia de la Temática

La presente tesis de maestría fue enmarcada en el proyecto EOLI (Efficient Operation of Urban Wastewater Treatment Plants, proyecto financiado por la Comunidad Europea) el cual tuvo como objetivo optimizar y automatizar la operación de sistemas de tratamiento tipo SBR (*Sequencing Batch Reactor*) para el tratamiento de efluentes de industria láctea.

Con la misión de lograr que esta tesis sea multidisciplinaria, se ha desarrollado una introducción enmarcada globalmente, pensando en el marco ambiental, el cual incluye los marcos económico, legal, científico, social y técnico. Luego el desarrollo de la investigación experimental se enfocó en el análisis de la comunidad microbiana de sistemas de tratamiento de efluentes de industria láctea, siendo esto último una pequeña contribución dentro de la problemática ambiental.

1.1 Marco legal y económico

Históricamente el ambiente ha sido considerado un recurso inagotable a merced del desarrollo industrial y económico. Sin embargo actualmente se ha comenzado a apreciar fuertemente el cuidado de los recursos naturales, y el nuevo concepto de desarrollo intenta resaltar la sustentabilidad y calidad de vida. El desarrollo sostenible (término utilizado en 2002 para la Conferencia de Johannesburgo, Cumbre del Desarrollo Sostenible/Sustentable) promueve acciones para evitar la dilapidación, el desaprovechamiento, y la degradación de los recursos, mejorando la calidad de vida actual y futura. Es cada vez mas frecuente que la sociedad se exprese con una postura “pro-ambiental” generando cierta presión en los tomadores de decisiones, muchas veces a nivel político, legal y económico, lo que ha implicado un desarrollo de las políticas empresariales en cuanto a su gestión ambiental.

Actualmente el Uruguay posee un marco legal por el cual define las normas para

prevenir la contaminación del medio ambiente. En este aspecto se pueden reconocer algunos hitos en la legislación ambiental uruguaya como:

- 1971 Ley 14.053. Se crea el INPMA (Instituto Nacional de Protección del Medio Ambiente, que funcionaba en el ámbito del Ministerio de Educación y Cultura)
- 1990 Ley 16.112. Creación del MVOTMA (Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente) donde se establecen las competencias del mismo
- 1994 Ley 16.466. Creación de la LEIA (Ley de Evaluación de Impacto Ambiental)
- 1996 Constitucionalización de la protección del ambiente. Artículo 47 de la Constitución de la república: *“La protección del medio ambiente es de interés general. Las personas deberán abstenerse de cualquier acto que cause depredación, destrucción o contaminación graves al medio ambiente. La Ley reglamentará esta disposición y podrá prever sanciones para los transgresores”*. Este artículo fue la plataforma para la el advenimiento de leyes que explícitamente buscan la protección del ambiente.
- 2000 Ley 17.283. Creación de la LGPA (Ley General de Protección del Ambiente). El objetivo de esta Ley es, en cumplimiento del mandato previsto en el artículo 47 de la Constitución, establecer previsiones generales básicas atinentes a la política nacional ambiental y a la gestión ambiental coordinada con los distintos sectores públicos y privados.

En el caso específico de la industria, cada vez se enfrenta a mayores requerimientos legales en cuanto a la gestión ambiental, e incluso a nivel de mercado existe cierta competencia “ecológica” que ha llevado a que las mismas deban adaptarse a tecnologías limpias que no generen impacto ambiental negativo. Actualmente muchas industrias

optan por sistemas de certificación de gestión calidad ambiental como la norma ISO14000 para competir en el mercado.

En nuestro país, aún existen vacíos legales en cuanto a la reglamentación de emisiones gaseosas y disposición de residuos sólidos industriales. Sin embargo existen varios proyectos para fortalecer estos aspectos, y ante el vacío legal en normativas nacionales de calidad de aire se formó en 1999 un comité multi institucional de gestión ambiental (GESTA-Aire) para elaborar estas normas bajo la coordinación de la DINAMA. La propuesta técnica de estándares de inmisión y fuentes móviles se encuentra pendiente de aprobación desde el año 2001 (Informe Ambiental-Geo Montevideo, 2004).

Para el caso de vertidos líquidos industriales, el Uruguay cuenta con el Decreto 253/79 (reglamenta al Código de Aguas, Ley N° 14.859) el cual es específico para cursos de agua. En dicho decreto los cursos de agua del País son clasificados en cuatro clases según su uso actual o potencial. De acuerdo a esta clasificación (realizada por el MVOTMA, en acuerdo con OSE para los cursos de clase 1) se establecen los parámetros que deben cumplir con sus respectivos límites. Allí se establece que sólo se permitirá el vertido de efluentes en los cursos de agua si los mismos no perjudican la calidad de las aguas receptoras. Los parámetros controlados son entre otros: pH, OD, DBO5, aceites y grasas, detergentes, amoníaco libre, nitratos, fósforo total, sólidos suspendidos, etc. En cuanto a los compuestos nitrogenados, se establece que el límite máximo de nitrato para cursos de agua clase 1, 2 y 3 es de 10mgN/L, y de amoníaco libre 0.02 mg/L. Cuando algún cuerpo de agua no cumpla las condiciones establecidas para la clase en que fuera clasificado, el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente deberá establecer los programas de recuperación de dicho cuerpo de agua, tendientes a que se alcancen las condiciones adoptadas.

Los efluentes en si mismos además tienen que cumplir con el artículo 11 del Decreto 253/79 donde la concentración de amoníaco en el efluente no debe exceder los 5 mgN/L si es desagüe directo al curso de agua, siendo ilimitado en caso de ser vertido a colector o por infiltración a terreno.

El MVOTMA es quien realiza las intimaciones correspondientes determinando las condiciones que deben cumplir los efluentes. Además ejerce el control general de la aplicación de estas normas pudiendo requerir de las Intendencias Municipales y de O.S.E. las acciones necesarias, en función de lo dispuesto por la normativa.

En el Artículo 32° del Decreto 253/79 se establece que las infracciones a las normas establecidas en el mismo serán sancionadas, de conformidad con el artículo 147 del Decreto - Ley N° 14.859 según distintos criterios especificados.

Por ejemplo establece que en el caso de no respetarse los plazos otorgados para la construcción de la Planta de Tratamiento se cobrarán multas de:

1ra. vez 100 UR - 1000 UR

2da. vez 200 UR - 2000 UR

3ra. vez y siguientes 300 UR - 5000 UR

Por ejemplo por realizar vertidos sin tratamiento a un cuerpo receptor teniendo planta de tratamiento construida y aprobada las multas son:

Sin antecedentes 200 UR - 3000 UR

Con antecedentes 500 UR - 5000 UR

Además de las multas establecidas, el Ministerio podrá suspender o clausurar industrias hasta tanto no se cumpla con la normativa.

A pesar de existir dicha reglamentación, cabe aclarar que aún quedan por resolver algunos aspectos relacionados a la localización de las industrias y el efecto acumulativo de sus vertidos.

1.2 Efluentes industriales

El término efluente industrial se utiliza para denominar a todo líquido, sólido o gas proveniente de un proceso industrial. Las industrias han implementado tecnologías para el tratamiento de efluentes líquidos de manera que los vertidos cumplan las normativas vigentes, las cuales tienden a ser cada vez mas exigentes. Por ello es necesario investigar e implementar sistemas de tratamiento de efluentes que sean de bajo costo y eficientes en la remoción de contaminantes.

No todos los vertimientos representan los mismos riesgos. En este trabajo se centrará la atención en la industria láctea, donde se procesan diariamente volúmenes muy altos de leche, y se generan caudales de descarga de fluidos de cientos de litros por día.

1.2.1 Industria láctea en Uruguay

Dentro del ramo lácteo existen varios tipos de industrias, tales como plantas pasteurizadoras, queserías, etc. los cuales forman una parte importante de la producción nacional (Tabla I). Dicho ramo industrial es llevado a cabo en una parte importante del país, estando presente en todos los departamentos del territorio excepto en Tacuarembó, Rocha, Flores y Lavalleja (según los datos de SADI "solicitud de autorización de desagüe industrial" de la DINAMA) (Fig. 1).

Tabla I: Industrias del ramo lácteo con solicitud de autorización de desagüe industrial (S.A.D.I) en Uruguay (información obtenida de la DINAMA-MVOTMA)

Nombre	Localidad	Cuenca	Vertido	Tipo
Montevideo				
Conaprole Usina N°2	Montevideo	La Bahía	Colector	Leche pasteurizada
Conaprole (C.I.M.)	Montevideo	Arroyo Pantanoso	Colector	Leche pasteurizada
LEONARDO ADRIAN CRUZ	Montevideo	Falta Curso	Colector	Productos lácteos varios
Conaprole Central	Montevideo	La Bahía	Colector	Productos lácteos varios
Canelones				
Conaprole Canelones	Canelones	Arroyo Canelón Chico	Colector	Queso
Conaprole San Ramón - P9	San Ramón	Río Santa Lucía	Curso de agua	Queso
Luis Giovanelli Palleiro y José Nieto Coviello	San Ramón	Río Santa Lucía	Curso de agua	Dulce de leche
Alcides Fernandez	San Antonio	Río Santa Lucía	Curso de agua	Enfriado de leche
Maldonado				
Conaprole Maldonado	San Carlos	Arroyo Maldonado	Curso de agua	Leche pasteurizada
San José				
La Josefina	San José	Río San José	Curso de agua	Leche pasteurizada
Conaprole San Jose	Rincón del Pino	Arroyo Pavon	Curso de agua	Leche en polvo
Frigorífico Modelo La Boyada	La Boyada	Río de la Plata	Curso de agua	Queso
Lactosan (Gley)	Puntas de Valdez	Arroyo Mauricio	Curso de agua	Queso
Bonprole	Libertad	Arroyo del Tigre – 248	Curso de agua	Queso
Conaprole Villa Rodriguez (N° 8)	Villa Rodriguez	Arroyo Cagancha	Infiltración al Terreno	Productos lácteos varios
Colonia				
Valle Sauce S.A.	Tarariras	Arroyo Riachuelo	Curso de agua	Queso
Luis Alberto Artola Villanueva	Rosario	Río Rosario	Curso de agua	Queso
Conaprole Tarariras	Tarariras	Arroyo Sauce	Infiltración al Terreno	Queso
Seglar S.A.	Tarariras	Arroyo Sauce - 226	Curso de agua	Queso
Gualeguay	Tarariras	Arroyo Sauce - 226	Curso de agua	Queso
Granja Naturalia S.R.L.	Picada Benitez	Río Rosario	Curso de agua	Queso
Jesús S. Brasetti	Colonia Valdense	Río Rosario	Infiltración al Terreno	Queso
Howald & Krieg	Nueva Helvecia	Río Rosario	Curso de agua	Queso fundido

Margaritas	Tarariras	Arroyo Sauce	Infiltración al Terreno	Productos lácteos varios
Bantol S.A. (ex-Caprolet)	Tarariras	Arroyo Riachuelo	Curso de agua	Productos lácteos varios
La Magnolia LTDA.	Nueva Helvecia	Arroyo Cufre - 242	Curso de agua	Productos lácteos varios
Ecolat Uruguay (Ex - Parmalat Uruguay S.A.)	Nueva Helvecia	Río Rosario	Curso de agua	Productos lácteos varios
Granja Pocha	Juan L. Lacaze	Río de la Plata - 220	Infiltración al Terreno	Productos lácteos varios
Calcar	Carmelo	Arroyo de las Vacas	Curso de agua	Productos lácteos varios
Granja Piñerolo LTDA	Colonia Cosmopolita	Arroyo Cufre	Curso de agua	Productos lácteos varios
Soriano				
Conaprole Mercedes	Mercedes	Río Negro	Curso de agua	Leche en polvo
Quesería Helvética	Cardona	Arroyo Grande del Sur	Curso de agua	Productos lácteos varios
Florida				
Conaprole Florida	Florida	Río Santa Lucia Chico	Curso de agua	Productos lácteos varios
Treinta y Tres				
Calitt	Trinta y Tres	Río Olimar Grande	Infiltración al Terreno	Productos lácteos varios
Cerro Largo				
Coleme	Melo	Arroyo Conventos	Colector	Productos lácteos varios
Durazno				
Sociedad Fomento Durazno	Durazno	Arroyo Tomas Cuadra	Curso de agua	Leche pasteurizada
Río Negro				
Claldy	Young	Arroyo Negro	Curso de agua	Productos lácteos varios
Paysandú				
Conaprole Paysandu	Pueblo Esperanza	Río Uruguay	Infiltración al Terreno	Leche pasteurizada
Coleque	Quebracho	Río Uruguay	Curso de agua	Queso
Pili SA II	Parada Esperanza	Río Uruguay	Curso de agua	Productos lácteos varios
Pili	Paysandú	Río Uruguay	Colector	Productos lácteos varios
Rivera				
Conaprole Rivera	Rivera	Arroyo Cuñapiru	Curso de agua	Leche pasteurizada
Salto				
Inlacsá	Salto	Arroyo Ceibal Grande	Curso de agua	Productos lácteos varios

Sin embargo, la cuenca lechera de Montevideo (que comprende los departamentos de Canelones, San José, Florida y Montevideo) concentra mas del 60% de la leche producida en la República. Las zonas vecinas de Flores, Durazno, Lavalleja, y Maldonado integran la misma cuenca y proveen aproximadamente un 8% del total.

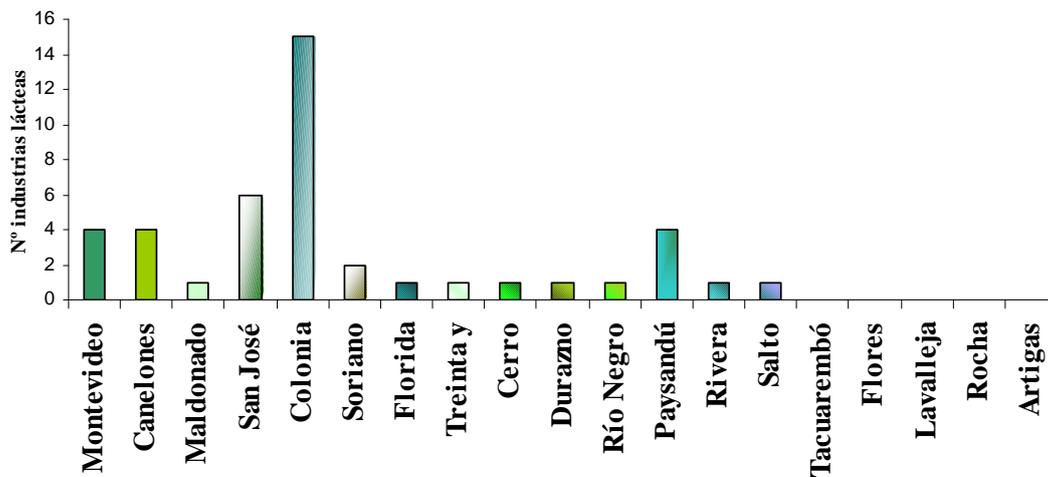


Figura 1. Distribución de las industrias lácteas en los distintos departamentos del territorio nacional.

En torno a las ciudades más pobladas se han desarrollado cuencas lecheras locales. Las más importantes cuentan con usinas pasteurizadoras. Por ejemplo en el caso de CONAPROLE se cuenta con sistemas de tratamiento en cada una de sus Plantas industriales habiendo desarrollado diferentes tecnologías. En Planta Industrial N° 14 (ubicada en la Ruta 5 en el Departamento de Rivera) desarrolló el primer sistema SBR (*sequencing batch reactor*) instalado en el país, donde una vez tratadas las aguas, se bombea a un predio agropecuario distante 2 Km, para su aprovechamiento en riego de forraje. En la mayoría de las Plantas ubicadas en zonas rurales se cuenta con tratamientos basados en sistemas de lagunas anaeróbicas y lagunas aireadas con funcionamiento de IAMC (aireación intermitente en mezcla completa), complementado con la instalación de humedales previos a los vertidos (<http://www.conaprole.com.uy>).

1.2.2 Problema ambiental

El 71% de la superficie del planeta está cubierta por agua y por lo tanto se considera el agua como uno de los recursos naturales más abundantes. Sin embargo, si se observa más detenidamente el presupuesto hídrico mundial, sólo una pequeña fracción está

disponible para el uso humano. Aproximadamente el 97 % es agua salada. Del restante 2.6%, la mayor parte está congelada en los casquetes polares y glaciares y en acuíferos subterráneos. La porción remanente disponible equivale al 0.014%, que es ínfimo a la luz de las crecientes necesidades humanas (<http://www.minag.gob.pe>)

América Latina muestra uno de los mayores índices mundiales de consumo de agua por habitante, tanto por el uso doméstico o agrícola, como por el empleo de ríos para la generación de energía, etc. (<http://www.tierramerica.net>)

En Uruguay por mucho tiempo ha existido la "impresión" de la abundancia del agua en el país, debido a la disponibilidad del recurso hídrico en casi todo el territorio nacional. Esta situación condujo a la utilización indiscriminada del agua, descuidando su preservación. Esto ha provocado un creciente deterioro ambiental de los recursos hídricos del país. Los centros urbanos, las plantas industriales y los establecimientos agropecuarios pueden producir contaminación por el vertido de efluentes contaminantes sobre los cursos de agua si es que no se llevan a cabo tecnologías de manejo sustentable del recurso.

Dada la importancia del agua para la vida de todos los seres vivos, y debido al aumento de las necesidades de ella por el continuo desarrollo de la humanidad, el hombre está en la obligación de proteger este recurso y evitar toda influencia nociva sobre el mismo.

Entre los distintos tipos de uso del agua se destaca en la actualidad el de dilución de vertidos tanto industriales, domiciliarios, y pluviales, considerado como parte de la oferta ecosistémica que ofrecen los cursos de agua.

Sin embargo hay que tener en cuenta que si se realiza el vertido de efluentes a cursos de agua sin el debido tratamiento, se generan problemas ya que se supera la capacidad

autodepuradora de los mismos, e incluso se ha reportado que afectan la eficiencia de desinfección con Cloro en el proceso de potabilización (Young-Ho Ahn, 2006).

En los efluentes industriales (dependiendo del tipo de industria que lo genere) a menudo existen altas cargas de materia orgánica, en algunos casos esta es recalcitrante (con baja biodegradabilidad), acompañada de un alto contenido en sólidos, y otros componentes propios de cada proceso industrial.

En cuanto a los contaminantes nitrogenados y el fósforo cabe destacar que son las actividades agrícolas e industriales que han aumentado casi al doble la concentración de nitrógeno en la biósfera.

En cuanto al fósforo, este no presenta ciclo gaseoso, y se destacan dos reservorios: el geológico y el biológicamente activo. Muchas veces este elemento se encuentra formando complejos con sales y compuestos orgánicos, lo que le da la particularidad de tener alto tiempo de retención en un sistema, contrario a lo que ocurre con el NO_3^- . Este nutriente no presenta cambios de estado de oxidación (PO_4^-) pero podría tener distintos efectos dependiendo de la forma en la que se encuentra, por ejemplo formando complejos con Hierro, o como ortofosfato. (Bock et al, 1995; Brock y Madigan, 1991).

La descarga de compuestos nitrogenados y fósforo a cursos de agua provoca serios problemas como la eutrofización. El término "eutrofización" se refiere al proceso de cambio de un estado trófico a otro de nivel superior por adición de nutrientes. Es el enriquecimiento de las aguas superficiales con los nutrientes limitantes para el desarrollo de organismos fotótrofos como las plantas, algas etc. Si bien la eutrofización se puede producir en forma natural, normalmente está asociada a fuentes antropogénicas de nutrientes. Aunque tanto el nitrógeno como el fósforo contribuyen a la eutrofización, la clasificación del estado trófico normalmente se basa en el nutriente que representa

una limitación. Cuando ocurre este fenómeno comienza el desarrollo de biomasa algal, luego aumenta el consumo de materia orgánica por organismos heterótrofos los cuales para ello requieren de oxígeno, aumentando la DBO (demanda bioquímica de oxígeno), el contenido de dióxido de carbono y a su vez la acidez.

Los síntomas y efectos de la eutrofización son los siguientes (<http://www.fao.org>):

- Aumento de la producción y biomasa de fitoplancton, algas asociadas y macrófitas.
- Modificación de las características del hábitat debida a la transformación del conjunto de plantas acuáticas.
- Producción de toxinas por determinadas algas.
- Aumento de los gastos de operación de los sistemas públicos de abastecimiento de agua, además de problemas de gusto y olor, especialmente durante los períodos de proliferación de algas.
- Desoxigenación del agua, especialmente al finalizar las situaciones de proliferación de algas, lo que normalmente da lugar a una mortandad de peces.
- Colmatación y obstrucción de los canales de riego por las “malas hierbas acuáticas”.
- Reducción de la posibilidad de utilización del agua para fines recreativos.
- Pérdidas económicas debidas a la modificación de las especies ícticas, mortandad de peces, etc.

Además, en cuanto a la contaminación nitrogenada se debe tener en cuenta que el nitrito es altamente nocivo para la salud humana. Desde hace tiempo, se ha puesto de manifiesto que el principal efecto perjudicial para la salud derivado de la ingestión de

nitratos y nitritos es la metahemoglobinemia, es decir, un incremento de metahemoglobina en la sangre, que es una hemoglobina modificada (oxidada) incapaz de fijar el oxígeno y que provoca limitaciones de transporte de oxígeno a los tejidos. Una vez el nitrito en sangre es capaz de reaccionar con la hemoglobina y transformarla en metahemoglobina. En condiciones normales, hay un mecanismo enzimático capaz de restablecer la alteración y reducir la metahemoglobina otra vez a hemoglobina. Cuando la metahemoglobinemia es elevada, la primera manifestación clínica es la cianosis, generalmente asociada a una tonalidad azulada de la piel. Además, el nitrito puede reaccionar con compuestos nitrogenados formando nitrosaminas las cuales reaccionan fácilmente con las bases de los ácidos nucleicos y por tanto es un agente mutagénico y cancerígeno. Los límites indicados para el nitrato se deben a que es reducido fácilmente a nitrito en la boca y tracto digestivo por la flora normal (<http://www.gencat.net>)

1.2.3 Sistemas de tratamiento de efluentes

En la actualidad se realizan tratamientos para reducir la materia orgánica de los efluentes, la cual representa una importante fracción de los mismos. Habitualmente se realizan tratamientos de tipo **Primario** donde se produce la remoción de material particulado, grasas, etc., principalmente por procesos fisicoquímicos y **Secundario** donde el principal interés es la remoción de materia orgánica. Para este último se pueden utilizar sistemas de tratamiento biológico en condiciones anaerobias donde ocurre el proceso llamado metanogénesis, o sistemas de tratamiento biológico aerobios como el de lodos activados.

En el caso del tratamiento de efluentes en sistemas metanogénicos la materia orgánica sufre una serie de procesos oxidativos en los que participan distintos grupos de bacterias y que culminan en la formación de CH_4 y CO_2 . Sin embargo luego de esta etapa el

efluente aún conserva nitrógeno principalmente bajo forma de amonio, debido a la degradación de proteínas.

En los casos donde se utilizan lodos activados, dependiendo de la carga inicial de N del influente (agua residual que ingresa a la planta de tratamiento), el amonio puede ser transformado en nitrito y nitrato por nitrificación o puede ser asimilado, lo que implica que la carga nitrogenada permanecerá en el efluente o en la biomasa del lodo.

Debido a que el tratamiento secundario no logra reducir la contaminación nitrogenada ni el Fósforo es importante estudiar sistemas de postratamiento que sean aplicables en la industria. A estos últimos a menudo se les llama tratamiento de tipo **Terciario** cuyo objetivo es la remoción de nutrientes: N y P.

Los compuestos nitrogenados son nutrientes clave para el crecimiento de los seres vivos, así que el nitrógeno puede ser eliminado del agua si es asimilado por microorganismos, pero el manejo de la biomasa producida de este modo resultaría en sí un problema. Por eso, los procesos biológicos no asimilativos como la nitrificación y la desnitrificación, han sido la forma mas efectiva, y económica de eliminación de nitrógeno en aguas residuales. En algunos casos este tratamiento se aplica en dos etapas separadas físicamente. Donde un reactor es destinado a la etapa aerobia de nitrificación y otro reactor a la etapa anóxica de desnitrificación.

1.2.3a Sistemas de tratamiento terciario tipo SBR (sequencing batch reactor)

Una alternativa válida para remover la contaminación nitrogenada en un solo reactor es la utilización del sistema de tratamiento biológico tipo SBR (sequencing batch reactor). Este tipo de reactores son operados bajo una serie de periodos que constituyen un ciclo. El ciclo consiste generalmente en periodos de llenado, reacción, sedimentación,

extracción y fase inactiva (se puede omitir). Esta operación permite que un reactor simple actúe como una serie de reactores secuenciales y un clarificador. Durante el periodo de llenado el agua residual que ingresa es agregada a la biomasa del ciclo anterior que esta en el tanque. La extensión del periodo de llenado depende del volumen del SBR y la naturaleza del efluente de donde provenga. El llenado es intermitente y el reactor puede o no ser agitado durante ese periodo. Luego en el periodo de reacción el reactor puede o no ser aireado dependiendo del objetivo del mismo (Schmidell et al, 2007).

Este método biológico es aplicable para la remoción del amonio proveniente de efluentes y en este caso consiste en una primer etapa aerobia de nitrificación, seguido de una etapa anóxica de desnitrificación donde las formas oxidadas de nitrógeno son reducidas a N_2 o N_2O por bacterias desnitrificantes en condiciones anóxicas. Los reactores SBR nitrificantes/desnitrificantes están constituidos por un solo reactor que opera en discontinuo, en el cual se realiza la remoción de carbono, nitrógeno y fósforo. Esto se logra alternando en el mismo tanque las etapas aerobias y anaerobias (Fig. 2).

Entre las principales ventajas de estos reactores son los altos rendimientos de eliminación de nitrógeno, materia orgánica biodegradable, y la adaptabilidad a cambios en las condiciones de operación. Otra ventaja importante es que este sistema consta de un solo reactor donde ocurren las dos etapas (aerobia y anaerobia) abaratando los costos de inversión y mantenimiento. Por otro lado también existen otras ventajas de los SBR, como el hecho que puede prolongarse el tiempo de residencia del agua residual en el reactor en caso de ser necesario. Además es un sistema mas simple comparado con el de lodos activados, ya que suprime la necesidad de retornar el lodo bombeándolo desde un clarificador, y son mas flexibles en cuanto a la adaptación a grandes fluctuaciones de

agua residual entrante. Esto no ocurre en los sistemas de lodos activados donde un aumento en el flujo de agua residual entrante implica una disminución en el tiempo de residencia de la misma en el tanque de aireación.

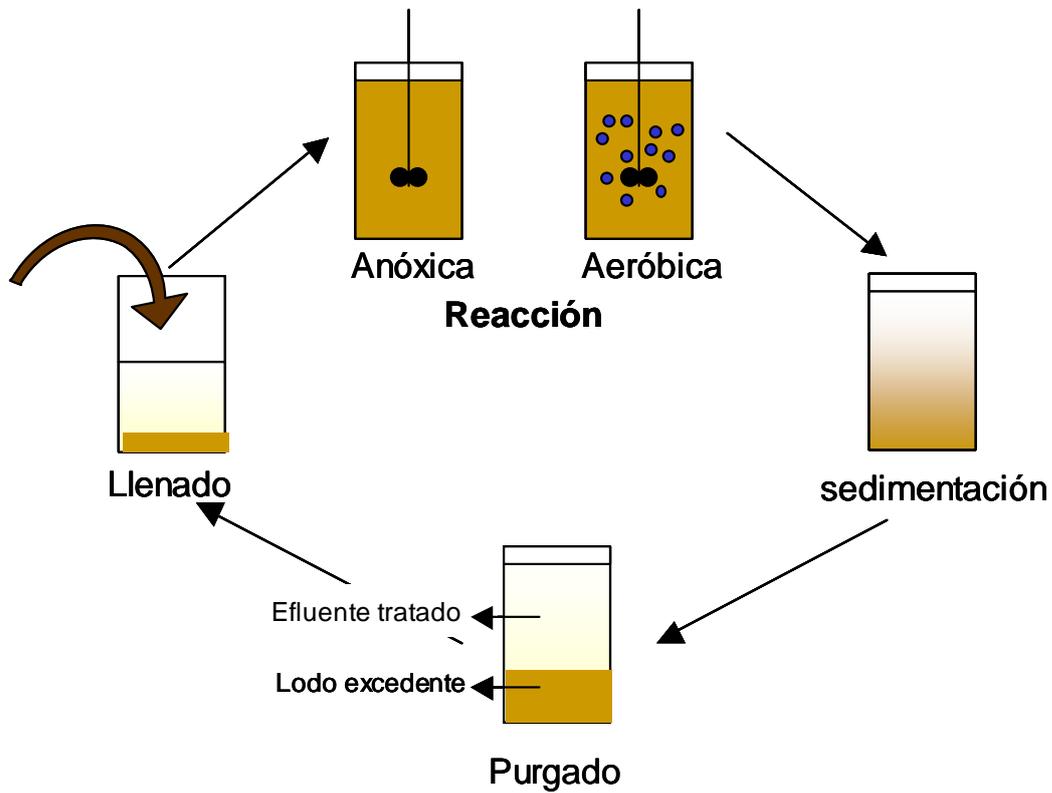


Figura 2. Etapas del ciclo de operación de un reactor SBR nitrificante-desnitrificante

1.3 Fisiología de la remoción de nitrógeno

Es frecuente que en el tratamiento de aguas residuales a gran escala no se contemplen los aspectos básicos de la fisiología de los microorganismos que intervienen en el proceso. Existen pocos estudios basados en los aspectos fisiológicos de la flora nitrificante y desnitrificante. El desconocimiento puede derivar en desviaciones o mal funcionamiento del proceso, lo cual se traduce en tecnologías no sustentables. Es por ello que a continuación se describen los procesos fisiológicos de la remoción de nitrógeno.

1.3.1 Ciclo del Nitrógeno

El nitrógeno se encuentra en la naturaleza en muchos estados de oxidación (su valencia estable oscila entre -3 en el amoníaco y +5 en el nitrato). Este elemento es componente de los aminoácidos, los ácidos nucleicos, los aminoazúcares y sus polímeros. El nitrógeno gaseoso (N_2) que constituye el 79% de los gases de la atmósfera es un reservorio importante aunque de incorporación lenta y compleja. El nitrógeno fijo en la naturaleza se encuentra formando parte de la materia orgánica y en minerales en forma de nitrato y amonio. El ciclo biogeoquímico del nitrógeno depende en gran medida de los microorganismos, ya que procesos claves del ciclo sólo ocurren gracias a la acción de determinados microorganismos.

El ciclo del nitrógeno (Fig. 3) "se inicia" con la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+), proceso al que se denomina fijación de N_2 , esta puede ser biológica (FBN, Fijación Biológica de Nitrógeno), o catalizada por descargas eléctricas (rayos) y de forma artificial para la fabricación de fertilizantes. Posteriormente, el amonio se convierte en nitrato (NO_3^-) mediante la nitrificación. El

amonio y el nitrato son asimilables por ejemplo por las plantas, que a su vez sirven para la nutrición del hombre y otros animales.

Por otro lado el nitrato se reduce a N_2 mediante el proceso de respiración anóxica llamado desnitrificación, lo que completa el ciclo del N en la biosfera. En condiciones anaeróbicas además puede darse la reducción de nitrato a amonio por procesos asimilativos o por un proceso desasimilativo (reducción desasimilativa de nitrato a amonio, del inglés DNRA). Este último es llevado a cabo en general por bacterias fermentadoras que compiten por el nitrato con las bacterias desnitrificantes en condiciones anóxicas (Atlas y Bartha, 2002; Schmidell et al., 2007).

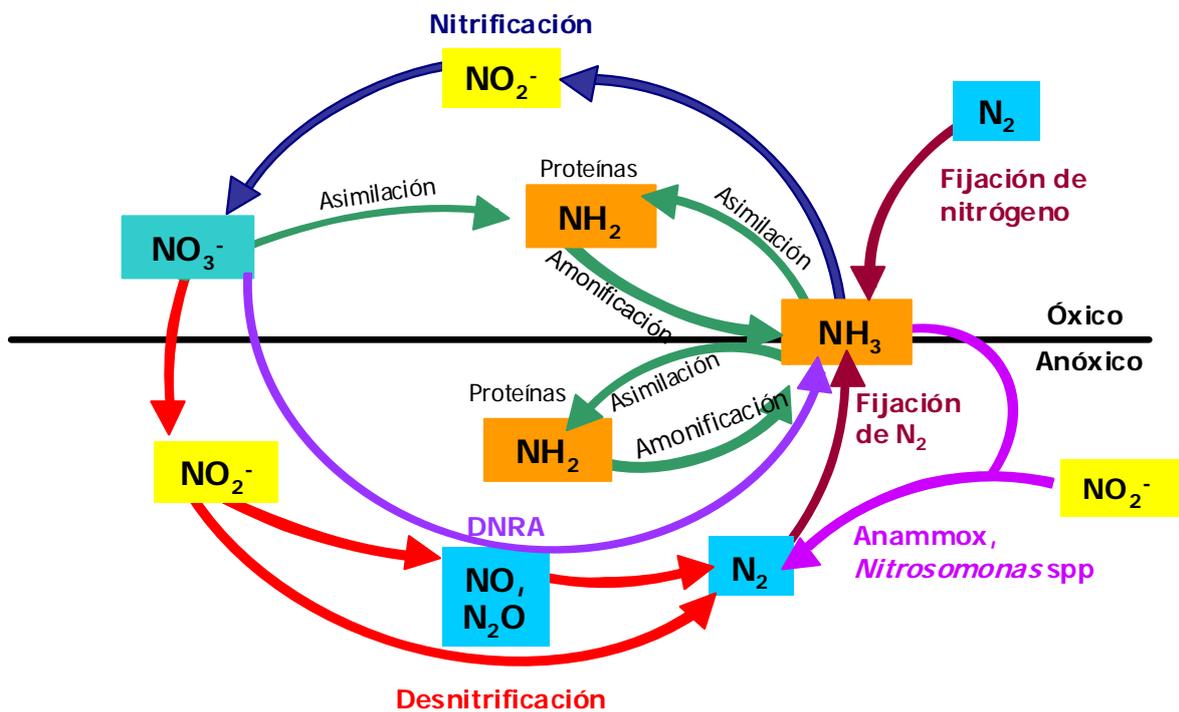


Figura 3: Ciclo biogeoquímico del N (Modificado de Cabezas, 2005)

En cuanto a la movilidad de los compuestos nitrogenados cabe destacar que las moléculas nitrogenadas móviles (ej: nitratos, nitritos, etc.) pueden llegar a cursos de agua y causar eutrofización. El principal impacto de origen antrópico en el ciclo de N ha sido la fabricación y uso excesivo de fertilizantes, creando desbalances por la transformación de N (g) no disponible en formas si disponibles. Por ese motivo la tasa desnitrificación “natural” resulta insuficiente para cerrar el ciclo. Además, el cultivo intensivo de leguminosas, ha provocado que la FBN (fijación biológica de N) también se vea altamente incrementada (Vitousek et al., 1997).

La reducción del N₂ a amonio (FBN, Fijación Biológica del Nitrógeno) es llevada a cabo por microorganismos procarióticos, tanto en vida libre como en asociaciones simbióticas con plantas. En todos los casos, la enzima que reduce el N₂ a amonio se denomina nitrogenasa. Para su funcionamiento requiere grandes cantidades de energía (ATP), y se inactiva en presencia de oxígeno y compuestos nitrogenados.

La fijación de N₂ en vida libre es llevada a cabo por bacterias diazotróficas para su propio crecimiento. Sólo cuando mueren se liberan al medio los compuestos orgánicos nitrogenados que se transforman en nitrato y amonio, que ya pueden asimilarse por las plantas o por otros microorganismos.

La fijación de N₂ en simbiosis es llevada a cabo por bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, conocidas con el nombre genérico de rizobios, y se caracterizan por infectar las células de las raíces de las plantas leguminosas y formar nódulos (estructuras características de la interacción bacteria-planta) en el interior de las cuales unas células especializadas, los bacteroides, reducen el N₂ a amonio. (Brock y Madigan, 1991)

1.3.2 Nitrificación

La nitrificación es el proceso biogeoquímico donde se da la oxidación de amonio a nitrato. El mismo es un proceso aerobio realizado por microorganismos Gram-negativos litoautotróficos que pertenecen a la familia *Nitrobacteriaceae*, no son esporulados y pueden ser de morfología esférica, bacilar o espiral.

En general, en las plantas de tratamiento terciario de efluentes, la nitrificación es la etapa más delicada, debido a que la flora nitrificante es sensible a cambios en el ecosistema (Schmidell et al., 2007). Debido a esto, es fundamental conocer cómo se afecta esta flora frente al agregado de tóxicos, lo cual fue analizado en el presente trabajo.

Este proceso respiratorio se lleva a cabo en dos etapas: 1) oxidación de amonio a nitrito y 2) oxidación de nitrito a nitrato. Estas etapas son llevadas a cabo por dos grupos de bacterias diferentes, donde la primera es realizada por bacterias oxidantes de amonio (AOB) y la segunda es realizada por bacterias oxidantes de nitrito (NOB).

Las bacterias nitrificantes crecen de manera autótrofa utilizando CO_2 como fuente de carbono y lo fijan mediante el ciclo de Calvin. Debido a que los potenciales redox de los pares $\text{NO}_2^-/\text{NH}_3$ y $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ son altos ($E_o' \text{NO}_2^-/\text{NH}_3=0.34\text{V}$ $E_o' \text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-=0.43$) donan electrones a la cadena de transporte de electrones en los últimos pasos del proceso global. Esto limita la cantidad de ATP que pueden obtener de cada par de electrones introducidos en la cadena respiratoria. Es por ello que se obtienen pequeñas cantidades de energía, lo cual explica el alto tiempo de duplicación de estas bacterias.

Debido a los requerimientos especiales de cultivo y a la lenta velocidad de crecimiento resulta muy complejo la obtención de cultivos puros de bacterias AOB y NOB. Esto

hace que sean difíciles de cuantificar mediante métodos cultivo-dependientes. Por lo tanto para monitorear los microorganismos nitrificantes es necesario acudir a herramientas cultivo-independientes. Para su detección y cuantificación actualmente se utilizan herramientas moleculares tales como: métodos basados en el ADN y/o el ARN (ej: FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*)), métodos basados en la medida de actividad enzimática (ej: medida de actividad nitrificante mediante respirometría) (Manser et al., 2005; Hertz et al., 2000)

En cuanto a las bacterias nitrificantes encontradas anteriormente en los reactores tradicionales para el tratamiento de efluentes, habitualmente se aislaban bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Sin embargo gracias al uso de herramientas moleculares se demostró que la diversidad de bacterias nitrificantes era mucho mayor que lo que se estimaba (Juretschko et al., 1998)

Bacterias oxidantes de amonio AOB

Los géneros de AOB comúnmente reconocidos son *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovobrio* (hábitat oceánico) y *Nitrosolobus* pertenecientes al dominio *Bacteria*. Las bacterias AOB son genéticamente diversas, sin embargo se encuentran relacionadas unas con otras principalmente dentro de la subdivisión beta y gamma-Proteobacteria (Fig. 4).

Son bacterias quimiolitotróficas que utilizan el amonio como fuente de energía en condiciones aeróbicas y fijan CO₂ mediante el ciclo de Calvin como fuente de C.

En el proceso de oxidación de amonio a nitrito participan dos enzimas (Fig. 5), la amonionooxigenasa (AMO) y la hidroxilamina oxido-reductasa (HAO). En un

primer paso la enzima AMO cataliza la oxidación de amonio a hidroxilamina (reacción oxígeno dependiente) que posteriormente se convierte en nitrito mediante la enzima HAO. La oxidación de la hidroxilamina aporta 4 electrones, único sitio reductor en donde se genera energía, lo cual explica por qué estas bacterias tienen un crecimiento muy lento, razón por la cual se dificulta su aislamiento y su identificación mediante técnicas cultivo-dependientes.

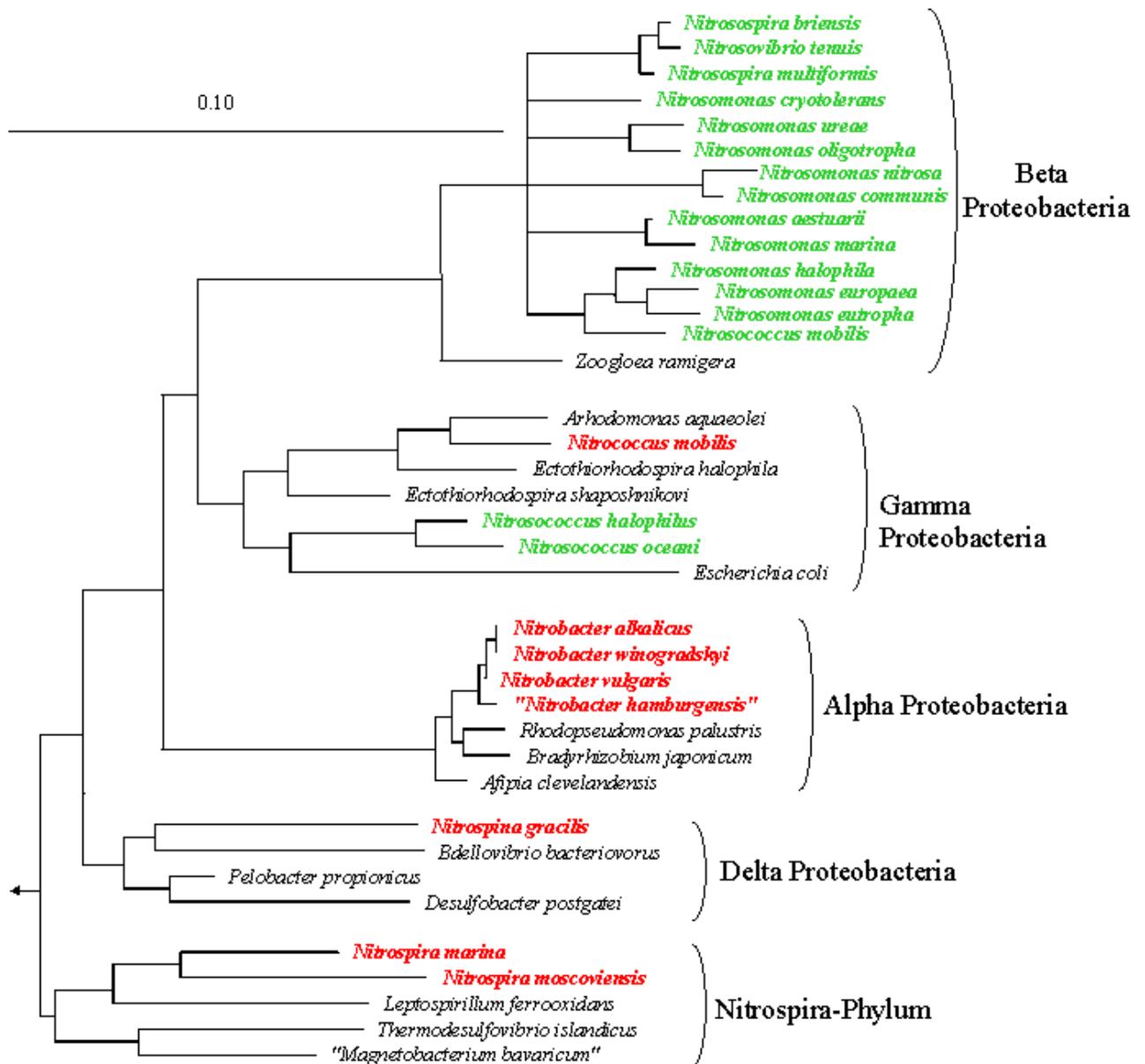


Figura 4. Árbol filogenético basado en el gen del ARNr 16S de las principales bacterias nitrificantes (AOB marcadas en verde, NOB marcadas en rojo) (Tomado de The Prokaryotes)

La estequiometría de la reacción de oxidación de amonio a nitrito es la siguiente:

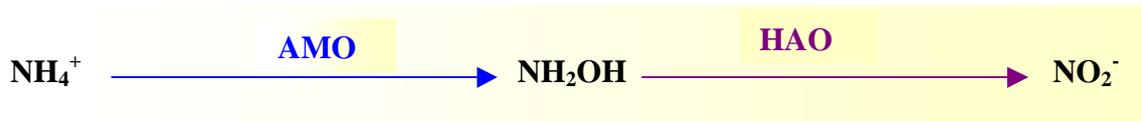
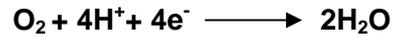
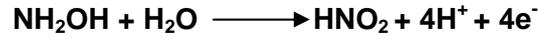
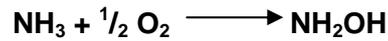


Figura 5. Reacción de nitrificación y enzimas involucradas. AMO: amoniomonooxigenasa; HAO: hidroxilamina oxido-reductasa.

La enzima AMO (Fig. 5) es la que se ha utilizado para estudiar las relaciones filogenéticas de las AOB, específicamente uno de los genes que la codifica: el gen *amoA*. (Young-ho Ahn, 2006; Shrestha et al., 2001; Purkhold et al., 2000)

La oxidación del amonio es un paso importante en el ciclo del nitrógeno, que durante los últimos 100 años se creía que sólo era realizado por bacterias. Sin embargo muy recientemente se han encontrado microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* capaces de realizar el proceso de oxidación del amonio (Nicol y Schleper, 2006; Park et. al., 2006).

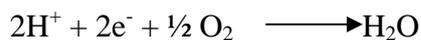
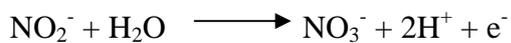
Bacterias oxidantes de nitrito NOB

Existen varios géneros que llevan a cabo la oxidación de nitrito a nitrato, como *Nitrospira*, *Nitrospina* y *Nitrococcus* (hábitat oceánico). El genero *Nitrobacter*, pertenece a la clase alfa-Proteobacteria, *Nitrospina gracilis* se agrupa dentro de delta-Proteobacteria, *Nitrococcus mobilis* dentro de gamma-Proteobacteria y las especies del genero *Nitrospira* pertenecen al phylum *Nitrospira* (Fig. 4).

La mayor parte de estas bacterias son quimiolitotóxicas, utilizan el nitrito como única fuente de energía, sin embargo algunas especies pertenecientes al género *Nitrobacter* son capaces de utilizar además fuentes de energía orgánicas. Al igual que las AOB, estas bacterias son autótrofas y fijan CO₂ como fuente de carbono.

Debido a su metabolismo se encuentran generalmente asociados a las AOB. La enzima que cataliza el pasaje de nitrito a nitrato es la nitrito oxidoreductasa (NOR).

La estequiometría de la reacción es la siguiente:



La reacción es reversible por lo que en condiciones anaerobias muchos NOB pueden reducir NO₃⁻.

1.3.3 Desnitrificación

La etapa anóxica consta de la reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso (vía nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso) y a este paso se le denomina “desnitrificación”. La desnitrificación clásica es un tipo de respiración heterótrofa que se lleva a cabo en condiciones de anoxia (baja tensión de oxígeno) y resulta en la producción de energía (ATP), lo que permite a las células crecer. En esta vía se utiliza nitrato como aceptor final de electrones, el cual luego de una serie de pasos es reducido hasta N₂ y en algunos casos sólo hasta N₂O. Los géneros desnitrificantes más citados incluyen: *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, y *Thauera*, entre otros. La mayoría de ellos son heterótrofos, pero algunos pueden crecer autotróficamente con hidrógeno y CO₂, o con compuestos del azufre reducidos.

Habitualmente se considera que los microorganismos desnitrificantes son principalmente aerobios que utilizan el nitrato en situaciones de anaerobiosis como una alternativa al O₂. Sin embargo, se han reportado microorganismos anaerobios estrictos desnitrificantes e incluso existen casos en los cuales se da simultáneamente la reducción de nitrato y de oxígeno lo cual confiere la capacidad de desnitrificar en presencia de oxígeno (por ejemplo en el caso de *Paracoccus pantrophus*, *Microvirgula aerodenitrificans* y *Thauera mechernichensis*).

En el proceso de desnitrificación están involucradas varias enzimas (Fig. 6):

- La nitrato reductasa (NAR), cataliza la reducción de nitrato a nitrito. Se han reportado dos tipos de NAR, una unida a membrana y otra periplasmática. Esta última es la que confiere la característica de desnitrificar en aerobiosis ya que no se inhibe en presencia de oxígeno. Sin embargo existe otro tipo de NAR soluble y asimilativa, utilizada por algunos microorganismos no desnitrificantes para utilizar NO₃⁻ como fuente de N.
- La enzima nitrito reductasa (NIR), cataliza la formación de óxido nítrico a partir de nitrito. Actualmente se conocen dos tipos, NIR cd1 presente en la mayoría de las bacterias desnitrificantes estudiadas y es codificada por el gen *nirS*, y la NIR Cu⁺² codificada por el gen *nirK*. Ambas enzimas son exclusivas de los organismos desnitrificantes.
- La óxido nítrico reductasa (NOR), cataliza la reducción de óxido nítrico a óxido nitroso.
- La óxido nitroso reductasa (NOS), cataliza la formación de gas nitrógeno a partir de óxido nitroso. Esta enzima habitualmente se encuentra en el periplasma, es muy

sensible al oxígeno y es inhibida por el acetileno. Gracias a ello es que se ha podido desarrollar un método capaz de medir la velocidad de desnitrificación midiendo la velocidad de producción de N₂O al inhibir el último paso de la desnitrificación con acetileno (Philippot, 2002; Sorensen, 1978).



Figura 6. Proceso de desnitrificación y enzimas involucradas. NAR: nitrato reductasa; NIR: nitrito reductasa; NOR: óxido nítrico reductasa; NOS: óxido nitroso reductasa.

Si bien existen microorganismos capaces de desnitrificar en los tres dominios (*Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*) estos se encuentran principalmente distribuidos dentro de la división Proteobacteria (principalmente alfa, beta y gamma) del dominio Bacteria. Sin embargo no todas las Proteobacterias tienen la capacidad de desnitrificar. Las bacterias con dicha capacidad se encuentran muy dispersas en el árbol filogenético, es decir que no siguen un patrón de distribución reconocible, lo que hace que sea muy difícil encontrar un método basado en el estudio del gen ARNr 16S para el análisis de comunidades desnitrificantes complejas (Zumft, 1997). Por lo tanto se han tenido que desarrollar métodos basados en el estudio de genes funcionales tales como *narH*, *nirS*, *nirK*, y *nosZ* (Philipot, 2002).

En cuanto al estudio de la desnitrificación en sistemas de tratamiento de efluentes, la mayoría de los estudios han realizado en sistemas de tratamiento estrictamente desnitrificantes (anóxicos) y de escala laboratorio (Etchebehere et al., 2002; Etchebehere et al., 2003). En los mismos se ha encontrado que la flora se mantiene estable durante la operación y se ha reportado que independientemente del tipo de alimentación se selecciona el mismo tipo de organismos, con una preponderancia de organismos pertenecientes a la clase beta del phylum *Proteobacteria*.

Algunas especies de bacterias desnitrificantes pueden generar exopolímeros que causan la flotación de los lodos, el cual es un problema para la etapa de sedimentación de los mismos (Cuervo López y Gómez, 2004).

En general los procesos de desnitrificación son aplicados a la remoción de nitrógeno, por lo cual son sistemas de tratamiento terciario en los que se espera que ingrese una baja carga de C orgánico con el influente. Esto es un problema ya que muchas veces las bacterias desnitrificantes son heterótrofas, por lo que a menudo en esta etapa se debe volver a agregar C al sistema. Este problema ya ha sido resuelto con sistemas de reciclo (Borzacconi et al., 1999) o el agregado de fuentes de carbono no fermentable como el metanol o aplicando otro tipo de tratamientos como la desnitrificación autótrofa.

La flora desnitrificante resulta interesante además, ya que algunas bacterias dentro de este grupo poseen la capacidad de remover compuestos recalcitrantes.

1.3.4 Vías no clásicas

Tal como se viene explicando se puede observar que tradicionalmente se consideraba la nitrificación como un mecanismo estrictamente aeróbico y autótrofo, y la desnitrificación como un mecanismo estrictamente anóxico. Sin embargo estudios recientes han sugerido la existencia de sistemas “no convencionales” de eliminación de nitrógeno entre los cuales se han reportado: la desnitrificación aeróbica, la nitrificación heterotrófica, la oxidación anaeróbica del amonio y la desnitrificación por bacterias nitrificantes autótrofas (Young-Ho Ahn, 2006; Mulder et al., 1995; Robertson et al, 1990).

Actualmente se sabe que la oxidación del amonio a N_2 (g) puede efectuarse en condiciones anaerobias con nitrito como aceptor de electrones, en el proceso descrito

como “ANAMMOX” (*anaerobic ammonium oxidation*, oxidación anaeróbica de amonio) el cual es llevado a cabo por bacterias autótrofas pertenecientes al linaje de los *Planctomycetales* (Jetten, 1997; Strous et al., 1997; Strous et al., 1999; Egli et al., 2001). Este proceso ha sido aplicado a nivel piloto para el tratamiento de aguas residuales urbanas y aguas residuales con un contenido alto de nitrógeno y materia orgánica limitada, como los efluentes de digestores anaerobios y a nivel real en la planta de tratamiento de aguas residuales instalada en Rotterdam, Netherlands (www.anammox.com). Actualmente se han descubierto nuevas especies anammox, entre ellas *Candidatus Brocadia catarinense* descubierta por el grupo de trabajo de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química-UDELAR con colaboración de la Universidad de Santa Catarina-Brasil. Esta especie se encontró en un reactor de laboratorio operado en condiciones anaerobias y baja relación de C/N. (Travers et al., 2006).

Además de las bacterias nitrificantes litoautótrofas se han encontrado varias bacterias heterótrofas como por ejemplo *Pseudomonas putida* (Daum et al., 1998), hongos y algas capaces de oxidar amonio a nitrito y/o a nitrato. Sin embargo, en la nitrificación heterótrofa no ocurre la generación de energía acoplada a este proceso como si ocurre en la nitrificación litótrofa. Como consecuencia de ello la nitrificación heterótrofa es dependiente de la oxidación de sustratos orgánicos (Focht y Verstraete, 1977; Killham, 1986; Papen et al., 1989; Kuenen y Robertson, 1987). Durante la nitrificación heterótrofa el amonio o las formas orgánicas de nitrógeno (ej. grupo amino de los aminoácidos) es cooxidado a hidroxilamina, óxidos de nitrógeno gaseosos, nitrito o nitrato. A pesar de ello, la nitrificación heterótrofa ha sido considerada un contribuyente marginal en lo que respecta al ciclo global de nitrógeno y podría tratarse de un mecanismo de detoxificación de compuestos amoniacaes (Brady, 1984; Brown, 1988).

Otro proceso no convencional es la desnitrificación llevada a cabo por algunas bacterias nitrificantes. Se encontró que la especie *Nitrosomonas europaea* es capaz de reducir el NO_2^- a N_2O y N_2 en condiciones limitantes de oxígeno con un 22% de conversión (Shrestha et al., 2001).

1.4 Fundamentos de la metodología a utilizar

Se sabe que menos del 1 % de los microorganismos de una muestra ambiental se pueden cultivar en el laboratorio, perdiendo la diversidad genética y bioquímica disponible. La biología molecular permite determinar las secuencias parciales de los microorganismos presentes en un ecosistema sin necesidad de cultivarlos y así se evitan los problemas asociados al cultivo en laboratorio. El estudio de los genes presentes en las comunidades microbianas permite caracterizar cuántos organismos participan y de que manera en una comunidad (Amann et al., 1995).

Este tipo de estudios están en fase de desarrollo, pero también es cierto que han abierto una puerta a muchos estudios de expresión y fisiología, que en el futuro podrían dar las claves del funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos más importantes del planeta. La tendencia actual en ecología microbiana es la combinación de las técnicas tradicionales de cultivo, y las técnicas moleculares para abordar el estudio de la diversidad de las muestras naturales.

En esta tesis se optó por utilizar técnicas clásicas de cultivo, análisis de aislamientos de microorganismos, medidas de actividad nitrificante, y herramientas de biología molecular como FISH (*Fluorescent in situ hybridization*), T-RFLP (*Terminal Restriction Length Polymorphism*), clonado y secuenciado de genes funcionales y del gen ARNr 16S.

Este último, con un tamaño de 1500 nucleótidos, o el ARNr 23S, con aprox. 3000 nucleótidos, son muy utilizados en estudio de comunidades bacterianas ya que ambas moléculas contienen la suficiente información como para realizar un análisis filogenético (Gutell et al., 1994). Existen muy buenas razones para utilizar como sitio

blanco de análisis a las moléculas de ARNr 16S de la subunidad pequeña del ribosoma (Amann y Ludwig, 2000):

- Función y distribución universal de la molécula de ARNr
- Estimado: 1-2% variación en la secuencia cada 50 millones de años
- Fácil de aislar y caracterizar
- Estructura secundaria conocida y secuencia comparable con otros organismos
- Abundancia de moléculas de ARNr dentro de las células que están activas, en crecimiento
- La aparente falta de transferencias laterales de genes en esta molécula, lo cual asegura que las semejanzas entre secuencias se asocian con cercanía en el tiempo evolutivo.
- Buen tamaño, de aproximadamente 1500 nucleótidos, con regiones muy conservadas y otras muy variables
- La existencia de un extenso banco de datos conteniendo las secuencias del ARNr 16S para un análisis comparativo con los de la muestra

A continuación se detallan los fundamentos de las técnicas utilizadas para el desarrollo de este trabajo.

1.4.1 FISH (*fluorescent in situ hybridization*)

Una manera muy habitual de visualizar el total de células en una muestra dada es el uso de intercalantes del ADN. Estos reveladores de ácido nucleico no discriminan entre células de distintas especies ni discriminan células activas de las muertas, pero son de gran utilidad para obtener un recuento aproximado del número total de células, y para la observación de su morfología *in situ*. Dentro de los reveladores de ácido nucleico utilizados con mas frecuencia para observar células en microscopio de fluorescencia se encuentran el DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; con una señal fluorescente azul cuando está unido al ADN) y el naranja de acridina. En este caso se utilizó el DAPI como tinción de células totales de cada muestra.

A partir de los avances en la biología molecular, surgió la posibilidad de utilizar sondas de oligonucleótidos con el fin de detectar determinadas secuencias de ácido nucleico presentes en la comunidad microbiana en estudio. La Hibridación In Situ Fluorescente consiste en la detección de microorganismos en base a su secuencia de ARNr específicas, y se realiza en las células morfológicamente intactas (whole cell hybridization). Se logra una gran selectividad basada en el uso de sondas de ADN (marcadas con un fluoróforo) complementarias a las secuencias blanco en el ARNr 16S o 23S (Fig. 7).

Una de las razones por la cual se realiza FISH utilizando como blanco las moléculas de ARNr y no las de ADNr, es que los genes que codifican el ARNr se encuentran en un bajo número de copias en cada célula, lo que hace que la señal emitida por el fluoróforo unido a la sonda complementaria, no sea suficientemente potente como para lograr su detección. En cambio el ARNr en una célula activa se encuentra “amplificado” (gran número de copias debido a un elevado contenido de ribosomas), logrando una mayor probabilidad de que la sonda se una a su sitio blanco. Por lo tanto, a cada célula podrá unirse un alto número de sondas marcadas (según el número de copias de ARNr), haciendo posible la detección de la señal emitida por los fluoróforos (Amann et al., 1990)

De este modo, al dirigirse la sonda al ARNr solo hibridan las células en estado activo (que conservan sus ribosomas debido a la síntesis proteica). La intensidad de fluorescencia es proporcional al número de ribosomas y por lo tanto a la actividad celular.

El uso de hibridación *in situ* para contar e identificar organismos fue propuesto por Olsen en 1986 (Olsen et al., 1986) Con FISH, no sólo se puede determinar la

morfología celular de microorganismos no cultivables y su abundancia relativa, sino también analizar la distribución espacial *in situ*. En este trabajo se utilizaron las sondas de oligonucleótido descritas en la Tabla II.

Esta técnica presenta como ventajas su especificidad y su rapidez. Además por ser un método directo de observación, se pueden identificar y cuantificar microorganismos que mediante técnicas cultivo-dependientes no sería posible. Esto ocurre por ejemplo con microorganismos a los cuales aún no se han encontrado medios de cultivo aptos para su aislamiento, o cuando se trata de microorganismos de crecimiento lento.

Tabla II. Sondas de oligonucleótidos utilizadas en el presente trabajo

Sonda	5' Secuencia de la sonda 3'	Dominio
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	<i>Arquea</i>
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>
Sonda	5' Secuencia de la sonda 3'	Dominio <i>Bacteria</i>
ALF1B	CGTTTCG (C/T)TCTGAGCCAG	alpha <i>Proteobacteria</i>
BET42a *	GCCTTCCCACCTTCGTTT	beta <i>Proteobacteria</i>
GAM42a *	GCCTTCCCACATCGTTT	gamma <i>Proteobacteria</i>
Nso1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	ammonia-oxidizing beta <i>Proteobacteria</i>
Nit3*	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	<i>Nitrobacter spp.</i>
Ntspa662*	GGA ATT CCG CGC TCC TCT	genus <i>Nitrospira</i>
Nsv 443	CCG TGACCG TTT CGT TCC G	<i>Nitrosospira spp.</i>
Nsm156	TATTAG CAC ATC TTT CGAT	<i>Nitrosomonas spp., Nitrosococcus mobilis</i>
NmV	TCC TCA GAG ACT ACG CGG	<i>Nitrosococcus mobilis</i>

* se deben usar con su correspondiente sonda de competencia

Los cultivos nitrificantes generalmente tienden a formar estructuras denominadas *flocs* (cúmulo, agregado de células muy compacto), cuya estabilidad parece depender de la formación de sustancias exopoliméricas (aún se desconoce su composición) que las mantiene fuertemente unidas. Esto impide realizar el recuento mediante FISH (excepto mediante el uso del microscopio confocal), razón por la cual a menudo se llevan a cabo diversos métodos para lograr la disgregación de estos gránulos sin romper las células (en este caso sonicated de la muestra). Además se utilizan software (en el caso de esta tesis el software Image ProPlus e Image ProExpress) para realizar el recuento celular en dichos gránulos con el fin de minimizar los errores de recuento del observador.

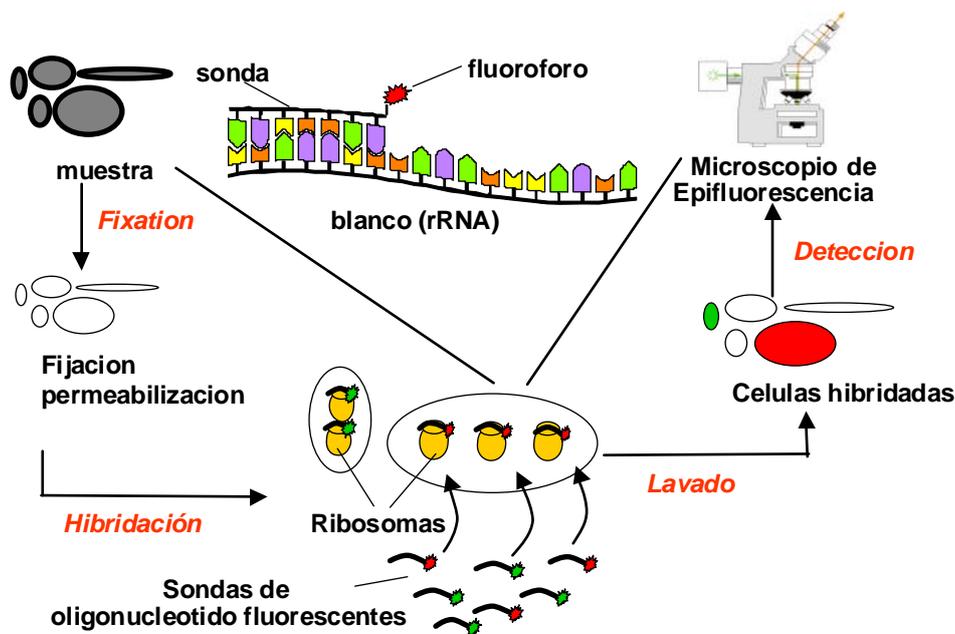


Figura 7. Metodología llevada a cabo para la hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

DISEÑO DE SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIPO

Para el diseño y selección de sondas para FISH se necesita un gran conocimiento acerca de las relaciones filogenéticas entre los microorganismos, ya que las sondas son diseñadas para grupos filogenéticos que no necesariamente concuerdan con los grupos fenotípicos. Es importante destacar que la especificidad de una sonda está basada en el

conocimiento actual de las secuencias del ARNr. En el futuro esta especificidad puede variar por la descripción de nuevas secuencias de microorganismos que no pertenezcan al grupo de interés, pero que puedan hibridar con la misma sonda por tener la misma secuencia blanco. Usualmente se diseñan oligonucleótidos de 18-25 bases aprox. Existen tres consideraciones importantes a tener en cuenta a la hora de diseñar una sonda con respecto a los mismatches (discrepancias con la secuencia complementaria a la sonda):

***número** de mismatches en un rango del 5%-30%.

***posición** de los mismatches, tratando que se encuentre por lo menos un mismatch en posición central entre la sonda y el ácido nucleico no deseado, disminuyendo así la probabilidad de uniones inespecíficas; por el contrario, en el caso de existir un mismatch entre la sonda y la secuencia blanco deseada, es preferible que se encuentre en un extremo de la sonda, para que este no interfiera con la hibridación

***tipo** de mismatch: G se apareará con alguna otra base

La Guanina (G) además de unirse con su nucleótido complementario (la Citocina (C)), puede unirse fuertemente con Timina (T). Esta unión no se considera mismatch ya que la fuerza de enlace no es considerada como tal. Cada nucleótido encuentra otro nucleótido con el cual presenta la máxima fuerza de enlace para ambos, a los cuales se les llama “nucleótidos complementarios”, por ejemplo Adenina-Timina, o Citocina-Guanina (Tabla III).

Sin embargo una unión es considerada “mismatch” cuando la **fuerza de enlace** según la tabla III entre los nucleotidos analizados es **menor** al resultado de la operación:

Fuerza máxima de enlace para ese nucleótido **menos 0.5**, de lo contrario, no es considerado como mismatch. Tal es el caso de la unión entre T y G, donde la **F_{max} de T es 1,1** (la cual se presenta cuando se une a A) y la **Fuerza de unión a T-G es 0,9**. Por lo tanto, **1,1 – 0.5 = 0.6 < 0.9** es decir, que no se considera como un mismatch a la unión de G con T.

Tabla III. Valores de la fuerza de enlace de cada unión nucleótido-nucleótido

	A	C	G	T
A	0	0	0,5	1,1
C	0	0	1,5	0
G	0,5	1,5	0,4	0,9
T	1,1	0	0,9	0

Es necesario conocer la estructura secundaria del ARNr para determinar si la sonda puede formar “*hairpins*” (estructuras con formas de lazos y tallos, no deseadas). Además, el conocimiento de la estructura del ARNr, de las zonas variables por ejemplo, es de gran ayuda para diseñar sondas dirigidas a esos sitios.

Se aconseja chequear las sondas contra las secuencias conocidas depositadas en bancos de secuencias como: RDP, OPD, o GenBank, para determinar cuan específica es la sonda teóricamente. Igualmente, al final, es necesario determinar la especificidad empíricamente (<http://Lynxified.Pages.de/pub/ARB/>).

Algunas propiedades celulares, influyen en la relación existente entre la intensidad de la señal de fluorescencia, y el contenido ribosómico de las células individuales; se sabe por ejemplo, que la fluorescencia conferida por las sondas marcadas, no solo depende del contenido original de ARNr celular, sino que también depende de la retención de estas moléculas durante el proceso de hibridación, y durante el almacenamiento de las muestras. Depende además, de la accesibilidad del sitio blanco en el ribosoma, y de las

condiciones de permeabilización. Por esta razón, si se utilizan diferentes sondas, debe tenerse en cuenta el tamaño (largo) de estas, y la eficiencia de unión al sitio blanco (Wallner et al., 1995).

1.4.2 Clonado y secuenciación

Hoy en día es posible abordar el estudio de la dinámica de un ecosistema natural a nivel genómico. Las moléculas de ADN extraídas a partir de muestras naturales (ADN procedente, en principio, de todos los genomas de la muestra cuya suma constituye el metagenoma de la misma) pueden ser secuenciadas tras ser clonadas en vectores con capacidad de incorporar los insertos (Rondon et al., 2000). Esta herramienta puede modificarse y en lugar de utilizar el genoma completo de la comunidad, hacerlo con genes específicos de un grupo microbiano. Para ello es posible utilizar la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction), o Reacción en Cadena de la Polimerasa, la cual ha hecho posible la clonación y otros tipos de análisis de secuencias específicas de ADN, sin necesidad de utilizar células viables. Esta técnica permite amplificar más de mil millones de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada de un genoma, siempre y cuando previamente se conozca al menos una parte de su secuencia de nucleótidos, para diseñar los primers. Estos primers se utilizan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN, catalizada por una ADN-polimerasa.

El clonado de ADN es un proceso por el cual se inserta un segmento de ADN de un organismo en otro. Es una técnica muy utilizada en biología molecular ya que permite separar fragmentos de ADN, donde cada fragmento queda insertado en un "clon" y este puede ser estudiado separadamente.

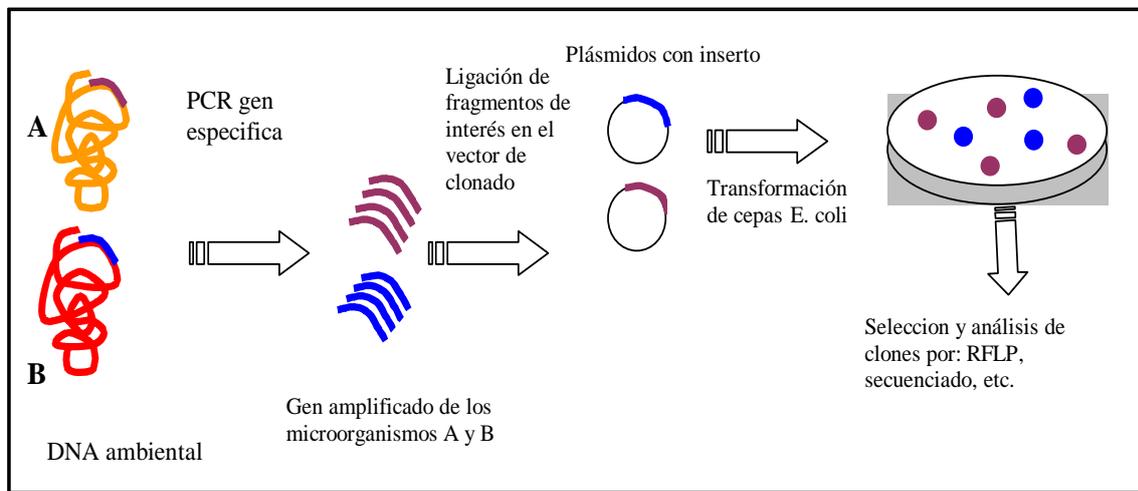
Para este tipo de clonación además del ADN de la muestra que se desea clonar (habitualmente se utilizan los amplicones resultantes de la PCR para el gen específico

en estudio), es necesario un vector de clonado donde se liga el inserto (por ej. un plásmido) y un hospedero el cual es transformado y multiplica la cantidad de vector durante su crecimiento (por ejemplo *E. coli*)

Los pasos básicos de esta técnica son primeramente la extracción de ADN de toda la comunidad microbiana y la amplificación de un determinado gen por PCR (por ejemplo el gen del ARNr 16S o un gen funcional). Luego esos amplicones son ligados en un vector que luego es utilizado para transformar las células competentes del hospedero (Fig. 8). Estas células son sembradas en placa donde forman colonias (clones). Estos clones pueden ser analizados mediante análisis de perfiles de restricción, o pueden estudiarse por secuenciación del inserto. De esta forma se obtiene una biblioteca genómica de clones donde cada clon tiene un gen proveniente de uno de los organismos de la comunidad. Estudiando un número suficiente de clones se puede lograr describir la composición de una determinada comunidad microbiana. Además gracias a esta herramienta se han detectado muchas especies que aun no han logrado aislarse en cultivo puro (Schmidell et al., 2007).

Específicamente en este trabajo se realizó el clonado y secuenciado de los ARNr 16S (para el análisis de la comunidad bacteriana total), *amoA* (comunidad oxidante de amonio), y *nirS* (comunidad desnitrificante). Para seleccionar los clones a secuenciar se llevó a cabo a cabo la restricción y el análisis de fragmentos de los clones (RFLP, restriction fragment length polymorphism) de manera que se secuenció por lo menos un clon representante de cada perfil de restricción. Se analizó la similitud de cada secuencia con las secuencias conocidas mediante el programa BLAST y corregidas mediante inspección manual. Además se realizaron árboles filogenéticos con las secuencias de cada clon secuenciado y las secuencias mas cercanas depositadas en el

banco de datos de manera de identificar el grupo y género al cual pertenecen y en lo posible identificarlos a nivel de especie.



1

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de los clones:

Esta es una técnica llamada de "huella genética" basada en el análisis de polimorfismos del largo de fragmentos de restricción. Se utilizan para ello enzimas de restricción (presentes en microorganismos como parte del sistema de defensa) las cuales cortan el ADN en secuencias específicas. Por lo tanto la técnica consiste en someter determinado ADN (puede provenir de la amplificación de un gen específico como en este caso: *amoA*, *nirS* y ARNr 16S) a la acción de una o más enzimas de restricción. El tamaño de los fragmentos dependerá de la secuencia de ADN por lo que dos moléculas de ADN con distinta secuencia generarán distinto patrón de fragmentos de ADN que pueden visualizarse en un gel de agarosa separándolos por electroforesis.

1.4.3 T-RFLP (*terminal restriction length polymorphism*)

Esta herramienta permite evaluar cambios en el tiempo y el espacio de una comunidad, así como también es útil para comparar la composición de comunidades microbianas diferentes. El T-RFLP es una herramienta de screening y diagnóstico debido a que

resulta altamente sensible y hábil, siendo mas rápida y precisa que otras técnicas como el DGGE (electroforesis en gel de gradiente desnaturizante), RFLP y ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, también nombrado como RFLP del gen ARNr 16S).

Si bien es cierto que el T-RFLP es una técnica útil para obtener el perfil de una comunidad en estudio, esta no proporciona la identidad de las especies presentes. Por lo tanto a menudo es necesaria la asignación de identidad a los T-RFs mediante la restricción in silico de secuencias del gen *amoA* depositadas en el banco de secuencias. Sin embargo, de esta forma en muchos casos no es posible identificar los taxones a nivel de especie ya que muchas de ellas comparten el mismo sitio de corte para las enzimas utilizadas. En este trabajo se combinaron los métodos de T-RFLP y clonado para obtener mayor información de las comunidades estudiadas. Para ello se realizo el clonado del gen en estudio (*amoA*, *nirS*, ARNr 16S) y se secuenciaron clones representativos de cada perfil resultante del RFLP (con enzimas de restricción). Para correlacionar las secuencias obtenidas con los datos de T-RFLP, se calculó el tamaño esperado para los T-RFs a partir de las secuencias del gen clonado (análisis de restricción in silico)

La técnica de T-RFLP se basa en el análisis de patrones generados en una serie de pasos que combinan PCR, digestión con enzimas de restricción y electroforesis (Kitts, 2001).

El ADN extraído de la muestra ambiental es sometido a PCR utilizando primers homólogos a regiones conservadas del gen de interés (ARNr 16S, *amoA*, *nirS*, etc.). Uno de los primers se encuentra marcado en el extremo 5' con una molécula de fluoróforo. Luego de amplificar el gen de interés de toda la comunidad mediante PCR

se lleva a cabo la restricción enzimática. Las mismas digieren los amplicones en sitios de reconocimiento específicos, habitualmente tetranucleótidos.

Los fragmentos de restricción resultantes son corridos luego en un gel de poliacrilamida (el caso de este trabajo) o en capilares en un secuenciador de ADN con detector de fluorescencia. De esta manera solo se visualizan los fragmentos terminales unidos al fluoróforo (Fig. 9).

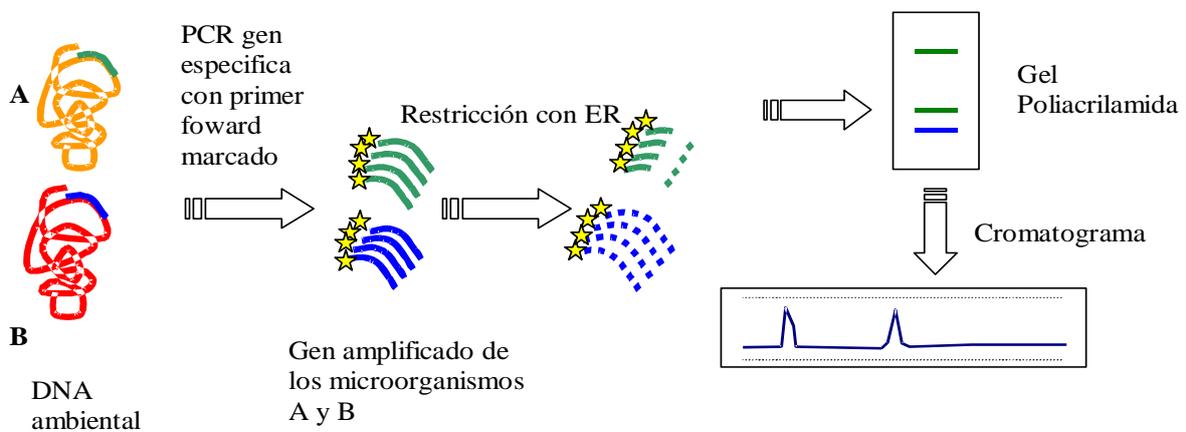


Figura 9. Esquema que muestra el procedimiento del T-RFLP a partir de una muestra ambiental. Luego de obtener el cromatograma se prosigue al análisis de T-RFs, es decir a las posiciones de cada pico y a su altura. Una cepa = Un T-RF = Un pico

Análisis de Biodiversidad

En este trabajo se analizó la diversidad microbiana presente en los sistemas estudiados en base a los resultados de T-RFLP. Para ello es necesario conocer los fundamentos teóricos de los índices que se manejarán como indicadores de diversidad.

Primero que nada se debe tener en cuenta que en el análisis de diversidad basado en los resultados de T-RFLP, se consideró como unidad taxonómica cada T-RF (fragmento terminal) es decir cada fragmento visualizado como un pico en el cromatograma. Estos picos pueden corresponder a una especie o a más de una, dependiendo de la secuencia nucleotídica en el sitio de corte terminal para cada enzima utilizada. Por lo tanto, en el

análisis de diversidad cuando se refiere a "número de especies", en realidad se trata en este caso al número de T-RFs.

DIVERSIDAD DE ESPECIES

La forma mas sencilla de medir la diversidad es contar el número de especies. El número de especies es el primero y más antiguo concepto de la diversidad, y se denomina riqueza de especies. Un segundo concepto de la diversidad de especies es el de heterogeneidad.

Otro concepto de diversidad basada en la riqueza de especies es el de Fisher, quien llego a la conclusión que:

$$S = \alpha \log \left(1 + \frac{N}{\alpha} \right)$$

donde S= numero de especies en la muestra

N= numero de individuos en la muestra

α = índice de diversidad

La constante α es una expresión de la diversidad de especies de la comunidad. Fisher informó que este índice de diversidad era independiente del tamaño de la muestra lo cual es importante para comparar distintos datos de investigaciones en áreas diferentes (Krebs, 1985).

Sin embargo, esta constante no tiene en cuenta la heterogeneidad de la muestra. Por lo tanto, mas que nada a partir de inquietudes de la "macroecología" es que han surgido una serie de preguntas como las que siguen a continuación.

¿Qué tan difícil seria predecir correctamente la especie del siguiente individuo que se capture?

Esta “incertidumbre” se puede medir con la función de **Shannon-Wiener**:

$$H = -\sum_{i=1}^S (p_i)(\log_2 p_i)$$

donde H= índice de diversidad (contenido de información de la muestra, bits por individuo)

S = número de especies

p_i = proporción del total de la muestra que corresponde a la especie i

El contenido de información da una idea de la magnitud de la incertidumbre, es decir que un mensaje como bbbbbb no tiene incertidumbre, y $H=0$.

La función Shannon Wiener combina los dos componentes de la diversidad: 1) el número de especies, y 2) la igualdad de la distribución de individuos en las diversas especies. Un mayor número de especies hace que aumente el índice de diversidad, e incluso la distribución uniforme o equitativa también aumentara el índice de Shannon Wiener (Krebs, 1985).

¿Cuál sería la diversidad de especies de esta muestra si todas las especies S tuvieran igual abundancia?

En ese caso tendríamos

$$H_{\max} = -S \left(\frac{1}{S} \log_2 \frac{1}{S} \right) = \log_2 S$$

Donde H_{\max} = diversidad de especies bajo condiciones de igualdad máxima y S = número de especies de la comunidad (Krebs, 1985). Entonces se puede definir “equidad o equitatividad” como la proporción siguiente:

$$E = H/H_{\max}$$

donde E = equitatividad (rango de 0 a 1); H = diversidad de especies observada y

H_{\max} = diversidad de especies máxima para ese número de especies

Cabe aclarar que el logaritmo utilizado para el cálculo del índice de diversidad “H” puede ser \log_2 , \log_{10} o \ln . Por lo tanto debe aclararse cual se utilizó para cada cálculo de manera de comparar los resultados en forma correcta.

Por otro lado, Simpson en 1949 planteó otra medida de diversidad, derivada de la teoría de probabilidades. Con este enfoque se plantea la siguiente pregunta:

¿Cuales son las probabilidades de que dos ejemplares seleccionados aleatoriamente en una comunidad infinita correspondan a la misma especie?

Índice de diversidad de Simpson = probabilidad de seleccionar aleatoriamente dos organismos de especies diferentes = $1 - (\text{probabilidad de seleccionar aleatoriamente dos individuos de la misma especie})$

Si una especie dada i está representada en la comunidad por p_i (proporción de individuos), la probabilidad de seleccionar dos de estos aleatoriamente es la probabilidad conjunta $(p_i)(p_i)$ o p_i^2 . Al sumar estas probabilidades para todas las especies i en la comunidad se llega a la diversidad de Simpson:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S (p_i)^2$$

donde D es el índice de diversidad de Simpson y p_i es la proporción de la especie i en la comunidad. La gama de valores es de 0 (diversidad baja) a $1 - 1/S$. Se ha planteado (pero hay diversas opiniones) que los hábitat inclementes o impredecibles favorecen la disminución de la diversidad ya que se seleccionan especies especializadas (Krebs, 1985).

1.4.4 Técnicas dependientes de cultivo

Dentro de las herramientas cultivo-dependientes utilizadas se encuentran la técnica del NMP (Numero Mas Probable), el recuento en placa, y técnicas de aislamiento en cultivo puro.

1.4.4 a. NMP (número mas probable de bacterias desnitrificantes)

El método de NMP permite estimar la densidad de población de una determinada muestra sin necesidad de contar cada célula o colonia. El mismo también es llamado método de dilución múltiple, y estima la población en base a la máxima dilución en la cual los microorganismos de interés presentan crecimiento.

Se basa en la determinación de la presencia o ausencia de un determinado tipo de m.o. (en función de que crezcan o de que produzcan determinada reacción en el medio), en cantidades decrecientes de muestra. Se analizan en forma paralela por triplicado o quintuplicado porciones de la muestra cada vez menores inoculadas en un medio líquido. Luego de la incubación, se observan y cuenta el número de tubos positivos.

Según el tipo de microorganismos que se desea contar se utilizan medios de enriquecimiento selectivo o medios nutrientes. En función de esto se puede considerar como positivos aquellos tubos en los que:

- 1) Hubo crecimiento que se detecta como aparición de turbidez (siempre que la muestra sembrada no enturbie el medio).
- 2) Exista detección de productos del metabolismo del microorganismo

Ocasionalmente, es necesario subcultivar cada uno de los tubos positivos, o presuntamente positivos a placa, o a otro tubo a efectos de confirmarlo.

El número de tubos (positivos) que se busca en las tablas para el informe final es el que resulta de esta etapa de confirmación, siendo el valor anterior sólo un valor presuntivo.

La interpretación de los resultados, se hace en base a una distribución de tipo Poisson, y en general se emplean tablas preparadas de acuerdo a la cantidad de muestra que se siembra en cada serie de tubos (<http://mail.fq.edu.uy/microbio/>)

Esta técnica se utilizó para estimar el número de bacterias desnitrificantes, sin embargo el NMP no es la concentración absoluta de un determinado organismo, sino apenas una estimación estadística de dicha concentración. Para ello se utilizó un medio selectivo (medio BCY acetato/nitrato, ANEXO 1) y se consideró positivo el tubo con crecimiento, viraje de color de la resazurina (de fucsia a incoloro), y ausencia de NO_2^- y NO_3^- según el análisis con el kit de bandas EM Quant (EM Quant® Nitrate Test. EM Science Gibbstown New Jersey 08027 Alemania). Los resultados se expresaron en NMP de bacterias desnitrificantes/ml de muestra.

1.4.4 b. Recuento y aislamiento en placa de heterótrofos aerobios totales

Este método de recuento permite determinar indirectamente el número de m.o. presentes en una muestra en base a que se desarrollen en medio de cultivo en placa, formando colonias. Por lo tanto se determinan por este método sólo las células microbianas viables en las condiciones de trabajo (nutrientes, atmósfera, temperatura). Como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término: Unidades Formadoras de Colonias (u.f.c.).

Las bacterias recuperadas en cada recuento pueden ser reaisladas en placa para de ese modo lograr trabajar individualmente con cada una y desarrollar distintas pruebas. En esta tesis se llevaron a cabo las pruebas GRAM, oxidasa, catalasa, y de desnitrificación. Para este último análisis se realizó un subcultivo de cada colonia pura en el medio

líquido BCY acetato/nitrato en atmósfera de N_2 . Luego de su incubación durante 24-72hs se observó si hubo crecimiento (turbidez), si el indicador redox viró (de fucsia a incoloro) y luego se llevó a cabo la medida de consumo de NO_2^-/NO_3^- . Se consideran positivos para la desnitrificación los viales que presentan crecimiento, viraje de color de la resarzurina (de fucsia a incoloro), y ausencia de NO_2^- y NO_3^- .

1.4.5 Medida de actividad desnitrificante

Existen algunas técnicas para medir la actividad desnitrificante, de las cuales la mas exacta y confiable se basa en la medida de N_2O en el tiempo luego de incubar la muestra en medio BCY acetato/nitrato en atmósfera con N_2 y acetileno. Sin embargo, debido a que no se cuenta con el equipamiento adecuado para ello, fue que se optó por realizar la medida de actividad desnitrificante basada en la velocidad de desaparición de NO_3^- .

Como se ha explicado anteriormente, la reducción de nitrato es catalizada por la enzima nitrato reductasa. Esta enzima también se encuentra presente en algunos microorganismos no desnitrificantes los cuales utilizan nitrato como fuente de N (The Prokaryotes). Los microorganismos reportados con dicha capacidad, en condiciones anóxicas realizan el proceso de fermentación. Para evitar que la medida de actividad resulte enmascarada por esta causa se utiliza en el medio BCY acetato/nitrato una fuente de carbono ya reportada como poco fermentable (muy oxidada) como lo es el acetato, y se trabaja en condiciones de anoxia (atmósfera de N_2). Es necesario medir la concentración de amonio al inicio y al final de la medida de actividad para descartar que la desaparición de NO_3^- sea causada por los microorganismos amonificantes.

1.4.6 Medida de actividad potencial nitrificante y heterótrofa

En la *actividad potencial* se mide la actividad máxima posible de los microorganismos presentes en la muestra para lo cual es necesario trabajar con los sustratos (NH_4^+ , NO_2^- y acetato) en concentraciones de saturación. La actividad potencial se puede relacionar con la cantidad de biomasa presente en el reactor.

Actividad nitrificante: Ya que son dos los grupos responsables de la nitrificación (AOB y NOB), la medida de actividad nitrificante implica determinar la actividad de estos grupos de bacterias. Dependiendo del método utilizado se puede determinar la actividad total, la actividad oxidante de amonio y/o la actividad oxidante de nitrito. Por ejemplo, los métodos basados en medir aparición de nitrito y nitrato, determinan la actividad nitrificante total. Inhibiendo la flora oxidante de nitrito con clorato se puede determinar la actividad oxidante de amonio, midiendo aparición de nitrito. Los métodos respirométricos permiten determinar la actividad de cada grupo por separado midiendo el consumo de oxígeno relacionado con el consumo de cada sustrato.

En el presente trabajo se desarrolló la medida de actividad oxidante de amonio y actividad oxidante de nitrito utilizando un electrodo de oxígeno, un cronómetro, un agitador magnético, y un aireador (Fig. 10). Los métodos respirométricos tienen la ventaja de ser rápidos y sencillos y para el caso de la actividad nitrificante permiten determinar la actividad de ambos grupos de microorganismos por separado (Cabezas A., 2005). La respirometría se basa en determinar la velocidad de consumo de oxígeno asociado a la utilización de un sustrato, en el caso de la actividad nitrificante, NH_4^+ y NO_2^- . **Actividad heterótrofa:** Los microorganismos heterótrofos utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía y oxígeno como aceptor final de electrones. La actividad heterótrofa potencial se realizó determinando el consumo de oxígeno

asociado a la oxidación de acetato. La actividad heterótrofa real se determinó como la velocidad de consumo de oxígeno asociado a la oxidación de los sustratos carbonados presentes en el influente. La actividad heterótrofa potencial se puede relacionar con la cantidad de biomasa heterótrofa presente que utiliza acetato (Cabezas A., 2005).

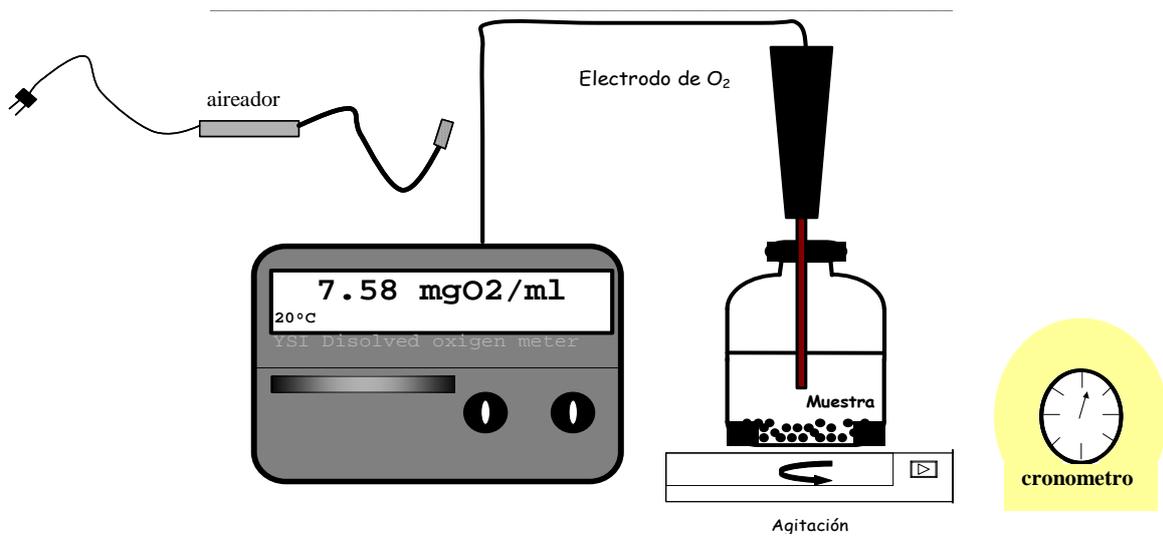


Figura 10: esquema del equipo utilizado para la medida de actividad potencial nitrificante y heterótrofa por el método respirométrico

1.5 Importancia y aplicaciones de los resultados de la tesis

Los sistemas de tratamiento de efluentes son diseñados en función de optimizar la eficiencia de remoción de contaminantes. Para ello es necesario establecer modelos teóricos y parámetros de control para la automatización de los procesos. Los resultados de esta investigación son muy importantes para obtener datos útiles en el modelado y la optimización de sistemas SBR de remoción de nitrógeno. En las ecuaciones de modelado de este tipo de reactores se asume que cierto porcentaje de las bacterias heterótrofas presentes en el sistema son bacterias desnitrificantes. En este trabajo se obtuvieron datos para verificar esta hipótesis. Además para dicho modelado es necesario poseer datos acerca de cual es la proporción de cada grupo microbiano y su actividad lo cual fue determinado en este trabajo. Para implementar el uso de sistemas biológicos es importante conocer el comportamiento de la flora tanto en condiciones estables como en condiciones desfavorables, estudiando su capacidad de recuperación frente a distintas perturbaciones. Los resultados de esta tesis lograron determinar que la flora relevante en el proceso de nitrificación y desnitrificación es capaz de recuperarse frente a perturbaciones en su ecosistema. Esto es muy importante en los reactores a gran escala ya que muchas veces en el efluente industrial llegan sustancias tóxicas, inhibitorias para los microorganismos. Globalmente los resultados ofrecieron utilidad para predecir y/o analizar el comportamiento biológico de las plantas de tratamiento de efluentes instruyéndonos acerca del funcionamiento interno del reactor. Esto aporta conocimientos vinculados con el sistema SBR que podrán ser extrapolados a los sistemas de tratamiento a gran escala. A su vez estos conocimientos podrían ser utilizados como insumos para adaptar sistemas de tratamiento existentes a sistemas tipo SBR de manera de mejorar la eficiencia de remoción de nutrientes.

Además, desde el punto de vista microbiológico y científico se obtuvieron datos importantes, como ser la identificación de la flora nitrificante, desnitrificante y heterótrofa mas abundante los sistemas estudiados de la cual existe relativamente poca información.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Determinar las condiciones de operación de reactores SBR nitrificantes/desnitrificantes para el tratamiento de efluentes de industria láctea de tal forma que la comunidad microbiana establecida presente una alta eficiencia de degradación de contaminantes nitrogenados.

2.2 Objetivos específicos

- Estudiar la variación de la flora microbiana frente a perturbaciones y cambios de operación del sistema.
- Analizar la influencia de los cambios de composición microbiana en la performance del reactor (desempeño en cuanto a la remoción de nutrientes).
- Identificar los principales microorganismos responsables de la actividad Nitrificante/desnitrificante.
- Aportar conocimientos microbiológicos que permitan ajustar las ecuaciones del modelado y optimización de reactores SBR para remoción de nitrógeno en la industria láctea.

3. Hipótesis y Preguntas a Responder

3.1 Hipótesis

Los cambios en la operación del reactor generan cambios en la composición de la comunidad microbiana. A su vez, los cambios en la composición de la comunidad microbiana generan cambios en la performance del reactor.

3.2 Preguntas a ser respondidas

¿Cómo se correlacionan los cambios en la estructura de la comunidad de bacterias con las variables de operación del sistema?

¿Los períodos de mayor actividad nitrificante del reactor se corresponden con la selección de especies con mayor actividad específica?; o se corresponden con un aumento en el número de la bacterias nitrificantes presentes?

¿Existe correlación entre la diversidad microbiana y la performance del reactor?

¿Cuáles son los microorganismos predominantes en el reactor y cual es su función en el mismo?

¿Todas las bacterias heterótrofas del reactor son organismos desnitrificantes?

4. Materiales Y Métodos

4.1 Reactores

En esta tesis se utilizaron muestras de lodo provenientes de dos reactores (F y M) SBR nitrificante/desnitrificante a escala de laboratorio (15L), operados en Facultad de Ingeniería en el marco del proyecto EOLI. En este trabajo se realizó el análisis de los primeros 650 días de operación de los reactores. Durante la operación de los reactores se indujeron perturbaciones de manera de analizar su incidencia en la eficiencia de remoción de nutrientes (*performance* del reactor) y la composición de la comunidad microbiana de cada reactor (Tabla IV a y b).

Los datos correspondientes al balance de remoción de nutrientes (remoción de DQO, Nt, N-NH₄⁺, etc.) en los reactores fueron obtenidos por la Facultad de Ingeniería, a partir de los cuales se llevaron a cabo análisis de correlación con los datos obtenidos en el laboratorio.

El reactor F es un reactor SBR nitrificante-desnitrificante alimentado con 4 L de influente (agua residual) El influente está compuesto por 75% efluente de salida de una laguna anaerobia escala real para el tratamiento de efluentes de industria láctea + 25% leche diluida y nitrato de sodio (NaNO₃). El NaNO₃ es agregado para simular aguas residuales provenientes de industrias lácteas que emplean ácido nítrico e hidróxido de sodio durante los lavados de rutina. La composición promedio del influente fue la siguiente: 83mgN-NH₄⁺/L; 3.2 mgN-NO₂⁻/L; 18mgN-NO₃⁻/L, 1000mgDQO¹/L, 110mgTKN²/L, pH=7,5. El reactor F fue operado con 2 ciclos idénticos por día (de 12 hs. cada uno). De acuerdo a los resultados obtenidos en la *performance* del reactor se

¹ Demanda Química de Oxígeno

² Nitrógeno Total Kjeldahl

realizaron algunos cambios en la operación (en la ley de control), donde se redujo la fase de aireación, y se aumentó la fase anóxica siendo de 2hs al inicio y 2hs luego de la fase aerobia de 3hs (Fig. 11a).

El reactor M es un reactor SBR para remoción de carbono y nitrógeno, alimentado con 2 L de agua residual sintética de industria láctea preparada con leche diluida y NaNO_3 . Las características promedio del influente preparado son las siguientes: $80 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{L}$, 3000 mgDQO/L , 60 mgNTK/L , $\text{pH} = 6.2$. Las condiciones de operación del reactor constan de una etapa de llenado anóxico de 30min, 30min en anoxia, 10.5 hs de etapa aerobia, una hora de sedimentación y luego se realiza el vaciado del agua tratada. (Fig. 11b). El reactor M fue operado con 2 ciclos idénticos por día (de 12 hs. cada uno). La función de este reactor fue remover carbono y nitrato pero no se esperaba actividad oxidante de amonio.

Debido a que la performance del reactor no era buena (mala sedimentación y actividad heterótrofa inestable), luego de 100 días de operación se adicionó un polímero como floculante (5 mg/L en el interior del reactor). El floculante utilizado fue PRAESTOL 644 (Stockhausen GmbH & Co). Además, con el objetivo de aumentar la eficiencia de remoción de DQO, y con la hipótesis de que la fase aerobia del ciclo I era excesiva, luego del día de operación 450 se cambió la duración de las fases del ciclo (ley de control) aplicando el ciclo tipo II (Fig. 11b).

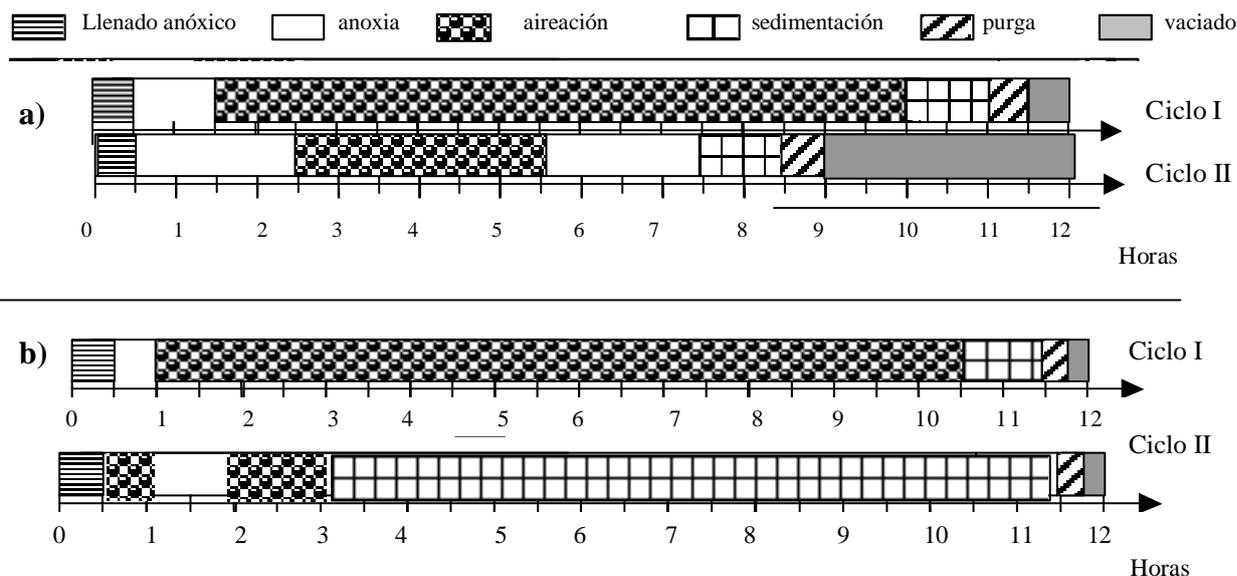


Figura 11. Esquema con las etapas y el tiempo de duración en los ciclos de operación del reactor F (a) y del reactor M (b).

Tabla IV: a) Perturbaciones ocasionadas durante la operación del lodo F. b) Perturbaciones ocasionadas durante la operación del lodo M.

a)			b)		
Tipo de perturbación a)	Día de operación	Etapas	Tipo de perturbación b)	Día de operación	Período
Operación normal	0-71	I	Operación normal	0-99	1
Reinoculación con sedimento de laguna	72-146	II	Agregado de polímero floculante	100-249	2
Agregado de alitiourea 0.69 uM	147-152	III	Aumento de carga orgánica (de 0.8 a 1.6 kgDQO/m3.d)	250-449	3
Agregado de alitiourea 1.03 uM	153-165	III	Reinoculación con sedimento de laguna	450---	4
Agregado de 4-Clorofenol 100mg/L	166-190	III	Cambio en la Ley de control	450---	4
Cambio en la Ley de control	191-494	IV			
Reinoculación con sedimento de laguna	495---	V			

* Laguna anaerobia del tratamiento 2^{io} de efluente de industria láctea

Toma de muestras:

El muestreo fue llevado a cabo por purgado de lodo homogeneizado durante agitación.

Las muestras destinadas a la medida de actividad se tomaron en la fase previa a la alimentación (fase final del ciclo) y se mantuvieron aireando durante 15-16hs. Las muestras destinadas a recuento por FISH, extracción de ADN, se tomaron en la misma

fase pero se mantuvieron a 4°C hasta ser llevadas al laboratorio. Las muestras para extracción de ADN se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

4.2 Medida de actividad potencial nitrificante y heterótrofa

Primero que nada se midió la concentración de amonio en el lodo mediante el método de salicilato-hipoclorito (ver sección 4.4). Las muestras en las que el amonio remanente era mayor que 1µg/ml fueron aireadas toda la noche (18hs aprox) para que todo el sustrato fuese consumido, o cuando el lodo presentó buena sedimentabilidad se realizaron lavados con agua destilada dejando sedimentar el lodo. En este caso luego se resuspendió con buffer fosfato pH 8 y se adicionó solución de trazas minerales (según proporción recomendado para el medio BCY acetato/nitrato, ANEXO 1).

Se controló que la temperatura del lodo estuviese entre 20-23°C.

Se colocó el lodo en un frasco de volumen conocido (140 ml). Se agitó con agitador magnético siempre a la misma velocidad. Se midió el oxígeno disuelto (OD), y en el caso de no estar saturado (mayor o igual a 7 mgO₂/litro de lodo) se aireó el lodo hasta llegar a saturación.

Para monitorear el consumo de oxígeno se midió el OD en el tiempo mediante el uso de un electrodo de oxígeno (YSI5010 OD probe).

La primer medida que se realizó en cada muestra fue la de actividad endógena, esta es la medida por el consumo de oxígeno sin agregado de sustrato (es favorable que esta actividad sea baja). Para ello se anotaron los valores de OD del lodo sin agregado de sustrato cada 15 segundos hasta llegar a un valor de 3mg/L o hasta llegar a 5-10 minutos de medida.

A continuación se realizó el mismo procedimiento luego del agregado de cada sustrato (KNO_2 10ppm N-NO_2^- , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60 ppm de N-NH_4^+ , y acetato de sodio-DQO 200 ppm) siempre controlando entre una medida y otra la concentración de OD y el pH.

Tanto las medidas tomadas luego del agregado de amonio como de acetato se realizaron mas de una vez (sin necesidad de agregar nuevamente sustrato ya que estos fueron agregados en exceso). Esto es importante ya que las oxidantes de amonio, tienen un tiempo (10-30 min) de activación, por lo cual se debería medir esta pendiente tantas veces como sea necesario hasta que se mantenga constante.

Se calcularon las pendientes máximas de las curvas de OD vs tiempo en un modelo lineal. Luego para obtener la **actividad oxidante de nitrito**, se realizó la resta entre la pendiente de nitrito (luego de agregar nitrito) y la pendiente de endógena. Luego los resultados se dividieron entre los sólidos suspendidos volátiles (SSV) del lodo.

Para la **actividad oxidante de amonio**, se realizó la resta entre la pendiente de amonio (luego de agregar amonio) y la del nitrito sin corregir (oxidantes de nitrito + endógena) sobre los SSV del lodo.

Para la **actividad heterótrofa** (oxidante de acetato) se realizó la resta entre la pendiente de acetato (luego de agregar acetato) y la pendiente de amonio sin corregir (oxidantes de amonio + ox. de nitrito + endogena) sobre los SSV del lodo.

4.3 Medida de sólidos suspendidos volátiles

- I) Se colocaron 10 ml de la muestra de lodo en un crisol limpio durante toda la noche (18hs aprox.) en la estufa a 100 °C.

- II) Luego de la incubación durante 18 hs. se colocó el crisol en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente.
- III) Se pesó el crisol con los sólidos totales
- IV) Luego se colocó en la mufla a 550 °C el crisol pesado y se incubó durante 2 hs.
- V) Se colocó el crisol en desecador y al llegar a temperatura ambiente, se pesó el crisol con los sólidos no volátiles
- VI) Los sólidos suspendidos volátiles son el resultado de

$$\text{gssv} = \text{Valor (III)} - \text{valor (V)}$$

Este valor corresponde a los 10 ml depositados por lo tanto para calcular gSSV/ml se dividió el valor calculado entre 10. Este valor se utilizó para calcular la actividad del lodo por gSSV.

Sólidos suspendidos por célula

La determinación de los sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) fue llevada a cabo con las cepas: *Thauera sp.* (bastón Gram negativo, cepa aislada en la Cátedra de Microbiología, Facultad de Química; Etchebehere y Tiedje; 2005), y la cepa F11 (bastón Gram positivo, proveniente del reactor F). Se utilizaron cultivos puros (en el medio líquido TSB) de ambas cepas y se llevó a cabo la medida de sólidos suspendidos totales y volátiles de un volumen conocido de cultivo (30 ml). Luego se realizó el recuento microscópico luego de una tinción con DAPI de 10 ul de cultivo y se calculó entonces el peso de SST y SSV por célula.

4.4 Medida de amonio por método de salicilato-hipoclorito

(Bower y Hansen, 1980)

Reactivos:

Solución estándar de amonio: se prepararon soluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de N para realizar la curva de calibración.

Solución Salicilato de sodio-nitroprusiato de sodio: se disolvió 7.813g de $\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_3$ y 0.125g de $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM 298) en 80ml de agua, y se llevó a 100 ml. Se conservó dicha solución en una botella oscura a 4°C.

Buffer Hipoclorito: se disolvió 14.8g de NaOH en 700ml de agua, se agregó 49.8g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 200ml de solución 5-5.25% de hipoclorito de sodio. Se ajustó el pH a 13 con NaOH y se llevó a 1000ml.

Solución de EDTA: se realizó una solución con 30g de EDTA-sodio en 400ml de agua, y se llevó a 500ml.

Procedimiento:

Primeramente se centrifugó a 7000 rpm la muestra de lodo (1.5ml) durante 2min. Se descartó el pellet y se prosiguió a la medida de amonio en el sobrenadante.

1. Se midió con pipeta aforada 1ml del sobrenadante de la muestra y se colocó en un vial no menor a 25 ml de capacidad.
2. Se agregó 1 ml de EDTA y se agitó.

3. Se agregaron 4 ml de solución de salicilato de sodio-nitroprusiato y se llevó a 20 ml con agua destilada.
4. Se agregaron 4ml de Buffer de Hipoclorito y se mezcló bien.
5. Se completó hasta un volumen final de 25ml con agua destilada.
6. Se incubaron los frascos en baño de agua a 37°C durante 30 min.
7. Se dejaron enfriar los frascos a temperatura ambiente (10 min) y se midió absorbancia a una longitud de onda de 667nm.

Este procedimiento se siguió de la misma manera para las soluciones estándares de manera de construir la curva de calibración. Esta curva se realizó cada vez que se comenzaba a utilizar una partida nueva de reactivos.

4.5 Medida de actividad desnitrificante

Muestra de lodo para actividad desnitrificante: se almacenó la muestra a 4°C durante un máximo de una semana previo a la medida de actividad.

Muestras de cepas puras para actividad desnitrificante: se partió de un cultivo puro en 500ml BCYacetato/nitrato, se centrifugó a 6000rpm durante 10min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 ml de buffer fosfato pH 7 complementado con sales minerales. Del volumen total obtenido, 150 ml fueron utilizados para el ensayo de respirometría, 40 ml para la medida de actividad desnitrificante (16 ml c/u, por duplicado) y 300 ul se fijaron para un posterior análisis por FISH.

Procedimiento:

Se dejó llegar a temperatura ambiente el lodo almacenado a 4°C. Para extraer el lodo a analizar se lo agitó con agitador magnético bajo corriente de N₂.

En el caso de este trabajo se tomaron 10ml de lodo (o el pellet de cultivo de cepas puras para actividad específica) y se agregó a un vial de 60 ml limpio y seco gaseado previamente con N₂. Se continuó gaseando durante 5-10 min con N₂.

Luego se le agregó agua destilada tal que completara un volumen de líquido final de 20 ml. El vial se agitó bajo corriente de N₂ durante 10 min, se cerró con un tapón de goma y precinto. A continuación se le agregó en forma simultánea y con agitación continua, 1 ml de KNO₃ 20 mM y 1ml de acetato de sodio 40 mM. Se tomó nota de la hora y se consideró a este punto como tiempo = 0 min. Se tomaron muestras a distintos tiempos (espaciadas 10-20 min. durante 1:30-2:00 hs de seguimiento). Luego se procedió a medir nitrato y nitrito de las muestras. Para ello se utilizó un H.P.L.C (Shimadzu) con columna de intercambio iónico (Ic pack anion) y detector UV. Como fase móvil se utilizó buffer fosfato pH 6.8. Se realizó una curva de calibración con estándares de NO₂⁻ y NO₃⁻ donde se analizó el cromatograma correlacionando el área de cada pico con la concentración de cada compuesto. Se calculó el N-NO₃⁻ consumido por unidad de tiempo (expresando actividad desnitrificante en ppm N-NO₃⁻/día)

4.6 FISH

FIJACIÓN CON PFA (Gram negativos y algunos Gram positivos)

Reactivos y soluciones:

Buffer PBS 3 x (390 mM NaCl , buffer fosfato 30 mM pH 7.2-7.4)

Se preparó 1000 ml de buffer fosfato de sodio 0.5 M pH 7.2 - 7.4 mezclando 280 ml de NaH_2PO_4 0.5 M, y 720 ml de Na_2HPO_4 0.5 M

Finalmente para 300 ml de PBS 3X se mezclaron 23.4 ml de NaCl 5M, 18.0 ml de buffer fosfato de sodio 0.5M, y 258.6 ml de H_2O

Solución 4% PFA-PBS (para 100 ml)

1. Se calentó en baño de agua 66 ml de agua destilada a 60°C
2. Se agregaron 4g de paraformaldehído (con cuidado ya que los vapores son tóxicos) y 100 uL de NaOH 10N. Se incubó hasta disolver el PFA (no debe tomar mas de 10-15 minutos).
3. Se agregaron 34 ml de PBS 3X, se enfrió a 20°C y se ajustó el pH a 7.2 – 7.4 con gotas de HCl 10 N.
4. Se almacenó a 4°C no mas de dos semanas o a -20°C durante aprox. tres meses.

Técnica de fijación con PFA:

1. Se centrifugó 1 volumen de células o suspensión de lodo (300 ul) a 7000 rpm 10min; se lavó el pellet con 1X PBS y se centrifugó nuevamente para luego descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 X PBS (300 ul)

2. Se agregaron 3 volúmenes (900 ul) de solución 4% PFA-PBS fría y se incubó por 1.5 a 18 horas a 4°C.
3. Se centrifugó a 7000 rpm, 10 minutos y se descartó el sobrenadante mientras que el pellet fue lavado agitando en vortex con 1X PBS. Se centrifugó nuevamente a 7000 rpm, 10 minutos y se resuspendió en 1X PBS (300ul).
4. Se agregó igual volumen de EtOH absoluto (300ul) mezclando bien. Se almacenó a -20°C.

FISH SOBRE PORTAS

Soluciones y buffers

Buffer de hibridación (se preparó en el momento)

Para 2 ml se mezclaron: 40 ul Tris-HCl 1 M pH 8, 360 ul de NaCl 5M, formamida, agua MQ, y 2 ul de SDS. El volumen de formamida agregado dependió del porcentaje de formamida necesario para cada sonda en particular y por lo tanto el volumen de agua varió de manera de completar un volumen final de 2mL (ANEXO 2)

Importante: el SDS siempre debe agregarse al final para que no precipite.

Buffer de lavado (se preparó en el momento)

Para 50 ml se mezclaron: 1 ml de Tris-HCl 1M pH 8, 500 ul de EDTA 0.5M (solo si formamida en buffer de hibridación era mayor a 20%), xxx ul de NaCl*, Agua Nanopure hasta 50 ml, 50ul de SDS (agregado al final)

* depende del % de formamida empleado (ANEXO 2)

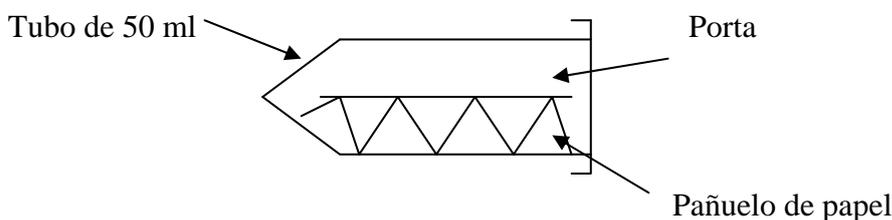
Preparación de DAPI

Se preparó una solución de DAPI (diamino-fenil-indol) con agua nanopure para hacer una solución stock de 250 ug/ml. Se alicuotó en eppendorf de 1 ml y almacenó en oscuridad a -20°C .

Para teñir: se descongeló una alícuota y se agregaron 9ml de agua miliQ para obtener una solución 25ug/ml. Se mantuvo fuera de la luz a 4°C .

PROCEDIMIENTO DE HIBRIDACIÓN:

1. Se colocaron 5-10 ul de muestra fijada en cada posición del porta y se secó al aire.
2. Se deshidrató con series de EtOH. Para ello se agregó 1 ml de EtOH 50 % y dejó reposar 3 minutos para deshidratar. Se repitió el procedimiento con EtOH 80 y luego con EtOH 96 %. Luego se secó al aire.
3. Se descongeló una alícuota de sonda de 50 ng/ul .
4. Se prepararon los tubos falcon de 50 ml para hibridación con pañuelo de papel adentro como se indica en el siguiente esquema:



5. Se prepararon 2 ml de buffer de hibridación por porta. Se colocaron 10 ul de buffer de hibridación por pozo y 1 ul de sonda (50 ng/ul).
6. Se utilizó el buffer de hibridación excedente para humedecer el pañuelo del tubo de hibridación.

7. Se colocó el porta dentro del tubo de hibridación e incubó a 46°C realizando la hibridación durante 90 minutos a 4 horas en oscuridad.
8. Se lavó el porta con 1 a 2 ml de buffer de lavado previamente calentado a 48°C para remover el buffer de hibridación.
9. Se sumergió el porta en buffer de lavado e incubó a 48°C, 10 minutos. En este punto se agregó 50ul ul DAPI 25ug/ml para 50 ml de buffer de lavado.
10. Se lavó cuidadosamente con agua MiliQ o destilada fría y se secó al aire en oscuridad.
11. Se montó el porta con aproximadamente 3ul de citifluor por pozo y cubrió con un cubreobjetos quedando listo para ser observado en el microscopio de fluorescencia.

Importante: luego de observar se puede retirar el cubre, lavar el porta, lavarlo con agua nanopure y guardar a -20°C por varios días o semanas. La señal decaerá.

4.7 Aislamiento de cepas

Se llevó a cabo el aislamiento de cepas a partir de placas de TSA sembradas con diluciones de las muestras de lodo. Se aislaron las cepas seleccionadas en base a la morfología de las colonias. Se determinó la capacidad de desnitrificación de cada cepa en base al consumo de NO_3^- y NO_2^- en medio BCYacetato/nitrato en atmósfera de N_2 .

4.8 Método de NMP (número más probable) de bacterias desnitrificantes

Se realizaron diluciones sucesivas de las muestras de lodo. Se sembró 1ml de cada dilución (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) por triplicado en viales con 10 ml de medio BCYacetato/nitrato en atmósfera de N_2 . Se incubó a 37°C 24-72hs.

En los casos en que hubo crecimiento y decoloración de la resazurina, se confirmaron los tubos positivos por desaparición de NO_3^- .

Se estimó el NMP de microorganismos desnitrificantes en base a las tablas preparadas de acuerdo a la cantidad de muestra que se siembra en cada serie de tubos (ANEXO 3).

4.9 Recuento en placa de heterótrofos aerobios totales

Se prepararon diluciones decimales sucesivas de la muestra de lodo en 9 mL de suero fisiológico (0.9 % NaCl) y así sucesivamente en condiciones asépticas. Cada vez que se preparó una dilución se agitó con Vortex para lograr homogeneizarla adecuadamente. Se sembraron por duplicado 0.1 ml de cada dilución (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) de cada muestra en placa TSA. Se incubó a 37°C 24-48hs. Posteriormente se realizó el recuento de colonias (a partir de placas con entre 30 y 300 colonias), se realizan los cálculos según la dilución y se informan las UFC (unidades formadoras de colonia) por ml de lodo.

4.10 Actividad desnitrificante y heterótrofa específica

Para llevar a cabo estas medidas se utilizaron las técnicas de recuento por FISH, NMP, respirometría, medida de sólidos suspendidos volátiles y actividad desnitrificante.

Para ello se prepararon 500 ml de cultivo puro fresco (24hs) de las cepas F23, F25 y F29. Se centrifugó 10 minutos a 6000 rpm. El pellet fue resuspendido en 200 ml de buffer fosfato pH = 7 complementado con sales minerales (según BCY acetato/nitrato). El cultivo concentrado se utilizó para determinar la actividad respirométrica, la actividad desnitrificante, recuento de células activas y totales por FISH, y peso seco.

La actividad desnitrificante de la cepa F25 se determinó de dos formas. La primera fue dejando el cultivo en condiciones aerobias de cultivo de manera de analizar el efecto de la fase aerobia previa a la etapa de desnitrificación. Por otro lado se determinó la actividad desnitrificante de la misma cepa, sin embargo en el segundo caso la misma fue incubada en condiciones de anoxia (atmósfera gaseada con N₂).

Para determinar la actividad por célula (desnitrificante y heterótrofa) se multiplicó la actividad específica (actividad por gramo de SSV) por los gSSV por célula calculados en este trabajo.

4.11 Extracción de ADN

ADN del lodo: Se tomó 1ml de cada muestra de lodo almacenada a -20°C y se llevó a cabo la extracción del ADN total de la comunidad bacteriana según el protocolo de extracción del kit UltraClean Soil DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Catalog #12800-100).

ADN de cepas puras: Se llevó a cabo la extracción de ADN de las cepas puras mediante la técnica de lisis alcalina: se agregan 100ul de NaOH 0.05M a 10ul de una suspensión de células (10^2 - 10^7 bacterias); se incuba a 95°C 15min; se centrifuga 2min a 12000rpm y se almacena el sobrenadante (contiene el ADN).

4.12 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)

Este método involucró varias técnicas detalladas a continuación.

PCR específica. Se llevó a cabo la amplificación por PCR a partir del ADN total de la muestra, con primers específicos para los genes ARNr 16S (Juretscho et al., 1998), *amoA* (Hortz et al., 2000), y *nirS* (Braker et al., 1998) según el grupo microbiano

analizado (bacterias, oxidantes de amonio, desnitrificantes) donde uno de los primers (en este caso los primers forward) está marcado con el fluoróforo 6-FAM (5-[6]-carboxy-fluorescein) (ANEXO 4).

Concentración en speed vac. Luego de obtener un total de aprox. 180-200 ul de producto de PCR (se mezclaron cuatro reacciones de 50ul cada una para cada muestra) se concentró en speed vac durante 2hs aprox. hasta obtener 20-30 ul.

Purificación por gel en 0.8% de agarosa low melting/TBE 1X y Bromuro de Etidio (c.f 5ug/ml). Se sembró la muestra (30ul aprox.) + 5ul de Loading Buffer en el gel y se corrió por electroforesis a 100 V en heladera (1.5hs). Luego se cortó la banda de ADN y se extrajo el mismo de la agarosa mediante el kit “Qiaquick Gel Extraction kit” de Quiagene según manual del fabricante. Se obtuvieron 30ul aprox. de producto purificado eluido en agua.

Tratamiento con enzimas de restricción. Se llevó a cabo el corte con distintas enzimas de restricción de cada producto de PCR concentrado y purificado. Los genes ARNr 16S y *nirS* se trataron con las enzimas *HhaI* y *MspI* por separado y el gen *amoA* con *CfoI* y *TaqI* por separado (ANEXO 5).

Electroforesis. Se preparó en un mix (sin guantes para evitar la contaminación con partículas de talco) con 2ul de producto de la restricción + 2ul formamida + 0.5 ul de estándar 5-TAMRA + 0.75 ul de LB (loading buffer).

Se desnaturalizó a 95°C durante 2 min e inmediatamente se colocó en hielo. Los fragmentos obtenidos en la restricción fueron separados (se sembraron 2ul de cada mezcla) en un gel de poliacrilamida utilizando un secuenciador automático ABI 373. Los fragmentos con extremo marcado con 6-FAM fueron detectados por el detector de

fluorescencia del equipo secuenciador. Se empleó el servicio de ATGEN-Facultad de Ciencias. Luego se analizaron los cromatogramas con los programas GeneScan asignando el valor a cada pico del estándar y estableciendo los parámetros indicados para el análisis de cada muestra, y el programa Genotyper (Applied Biosystems). Cada pico del cromatograma corresponde a un T-RF (o taxón), y su altura es proporcional a la abundancia del mismo en la muestra original.

Las condiciones de corrida fueron:

Run module: GS run 36 A-2400 (Filtro)

El equipo de secuenciador y el gel poliacrilamida utilizado fue manejado por el servicio de ATGEN en la Facultad de Ciencias.

Análisis estadístico de los resultados del T-RFLP

Para analizar cada cromatograma fue necesario llevar a cabo una serie de transformaciones en los valores obtenidos de manera de estandarizar los resultados. Esto fue importante ya que la cantidad de ADN (producto de la amplificación por PCR) no fue la misma para cada muestra lo cual podría ocasionar sesgos en los resultados. Para relativizar los datos del T-RFLP se aplicó una modificación de la estandarización realizada por Dunbar (Dunbar et al., 2001) (ANEXO 6)

Cálculo de los índices de diversidad

Para obtener los índices de diversidad de cada gen analizado en las muestras cada T-RF fue considerado como un taxón y la altura de pico como la abundancia relativa de cada taxón. Se utilizó el programa PAST (Hammer et al., 2006) para el cálculo de los índices de diversidad el cual aplica \ln en el cálculo de H.

Análisis de cluster

Los datos obtenidos en el T-RFLP (abundancia relativa y tamaño de T-RF) se agruparon jerárquicamente mediante el análisis de cluster. Los resultados se presentan en un dendograma en el cual las muestras que tenían similitud entre sí quedaron agrupadas (formando clusters). Los dendogramas se construyeron a partir de la matriz de distancia calculada en base a los índices de similitud de Sorensen-Dice, y de Morisita. El índice Sorensen-Dice se seleccionó como el índice de similitud de presencia/ausencia mas indicado para este tipo de comunidad ya que le da mayor peso a los casos de coocurrencia que a los mismatches (ocurrencia en A y no en B, siendo A y B muestras distintas). El índice Morisita fue seleccionado como índice de similitud cuantitativo ya que ha sido el mas recomendado entre los mismos (Norbis, 2005).

Se utilizó el algoritmo (método de agrupamiento) UPGMA que realiza la fusión de muestras según la distancia mínima promedio entre muestras y entre grupos, basado en el promedio aritmético de las distancias entre todos los miembros. Este es el algoritmo mas recomendado en la bibliografía para realizar el análisis de cluster (Kent y Coker, 1997).

Multidimensional Scaling (MDS)

El método MDS (Análisis de escalado multidimensional) es un test no paramétrico que trabaja con rangos (transforma la matriz en rangos) a diferencia del PCA que trabaja con espacios euclidianos. La técnica de "multidimensional scaling" está diseñada para construir un mapa a partir de la matriz de distancia entre muestras y presenta las relaciones entre los objetos dando solo una tabla de distancias entre ellos. El mapa puede ser en una dimensión (si los objetos se presentan en una línea), en dos dimensiones (en un plano), en tres dimensiones (representando los puntos en el

espacio), o en un alto número de dimensiones (donde la representación geométrica de los puntos no sería posible). Se utiliza para la reducción e interpretación de los datos multivariados basándose en una matriz de distancia y utilizando un algoritmo que coloca los datos en dos dimensiones "rankeando" las diferencias entre muestras (Manly, 1994).

En el análisis MDS además se analizó el gráfico de Shepard asociado. El mismo es una función de stress (o podría llamarse de ajuste) y puede expresarse con un único valor ≥ 0 . Lo ideal para este método es reducir este valor de stress lo más cercano a 0. El ajuste perfecto tendría un valor de stress=0. El gráfico presenta la relación entre rangos obtenidos y rangos observados, por lo tanto lo ideal como se menciona arriba sería que los valores de $X=Y$ (Martin y Paddy, 1997).

Análisis de Componentes Principales (PCA)

Se utilizó el método de análisis de componentes principales (**PCA**) como otra forma de reducir e interpretar la matriz de datos multivariados. El análisis por PCA encuentra variables hipotéticas (componentes) a partir de los datos donde cada componente explica el mayor porcentaje de varianza posible (por eso les llaman componentes principales). Este permite reducir el análisis de las muestras a dos variables (en un caso ideal) dando un gráfico para visualizar la relación entre muestras según cada componente. Por lo general el primer componente es el que explica el mayor % de varianza (Pla, 1986). Otra de las utilidades del PCA es que se pueden construir hipótesis acerca de cuáles serían los componentes principales que se correlacionan con las variables y que explican las diferencias entre muestras.

Para este análisis se utilizó la matriz de correlación (cuantifica la correlación entre dos o más variables) de manera de que no fue necesario probar normalidad de los datos

multivariables. Se seleccionó esta matriz por la razón mencionada anteriormente y porque al centrar y normalizar la matriz (realizar la división de los datos por la desviación estándar) los datos "outliers" (valores extremos) no distorsionan el análisis.

4.13 Clonado

Se realizó la amplificación por PCR del gen a clonar (*amoA*, *ARNr 16S*, *nirS*. ANEXO 4) a partir del ADN total de la muestra de lodo. Luego se llevó a cabo el procedimiento de clonado utilizando el vector de clonado 4-PCR TopoTA (Fig. 12) y células de la cepa de *E. coli* Top₁₀ según el manual del kit de clonado (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing. Invitrogen Catalog n° K4580-01).

Luego de la selección de clones en placa de LB Ampicilina-Kanamicina realizó la amplificación del inserto de ADN utilizando los primers T3 y T7 del kit. Se seleccionaron los clones con el inserto de tamaño esperado. Se llevó a cabo el tratamiento con enzimas de restricción de los clones (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) con las enzimas *HhaI* y *HaeIII* (para clones *ARNr 16S* y *nirS*), enzimas *CfoI* y *TaqI* (para clones *amoA*). Se agruparon los clones con el mismo perfil de restricción. Se seleccionaron clones representativos de cada perfil y se secuenciaron los insertos para su identificación.

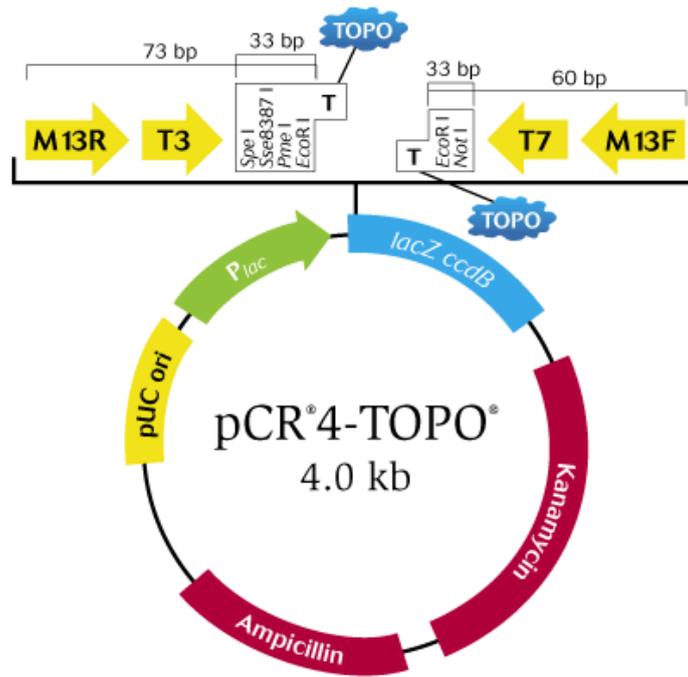
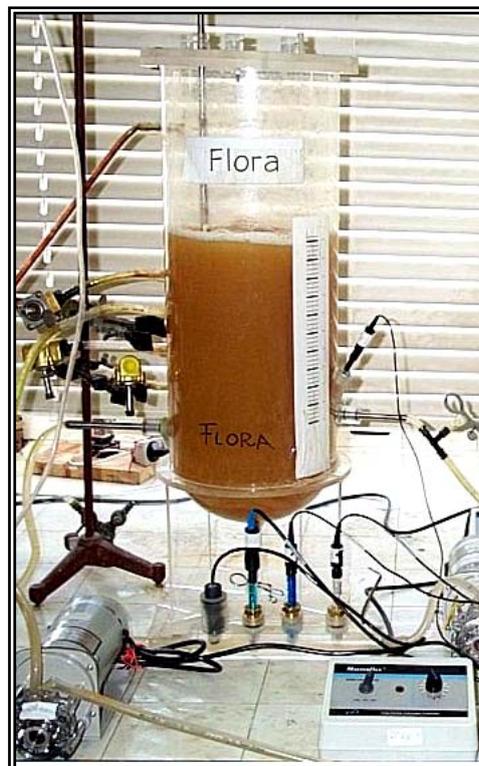


Figura 12. Esquema del mapa genómico del vector de clonado utilizado en esta tesis. El mismo es un plásmido (pCR®4-TOPO) de un tamaño de 4 kb.

5. Resultados y Discusión

5.1 CAPITULO 1

Reactor F



5.1.1. Actividad respirométrica del reactor F

Optimización del ensayo

Previamente se reportó que la medida de actividad respirométrica es reproducible y que existe linealidad entre la actividad potencial medida y la biomasa del grupo microbiano en estudio (Cabezas, 2005). Esto permitió utilizar la medida de actividad para el seguimiento de la biomasa nitrificante (de acuerdo a la actividad nitrificante) y heterótrofa desnitrificante (actividad oxidante de acetato) presente en reactores.

Para la medida de actividad oxidante de amonio, luego de la adición del mismo, fue necesario un período de aproximadamente 20-30 minutos con aireación continua antes de medir el consumo de oxígeno, de manera de lograr la completa activación enzimática tal como se ha reportado previamente (Stein y Arp, 1998).

Por otra parte, ya que existe cierta influencia del pH y la temperatura sobre la actividad (Cabezas, 2005), en esta tesis se realizó el ensayo de actividad siempre al mismo pH y temperatura ajustando dichas variables cuando era necesario.

Antes de llevar a cabo el seguimiento de la actividad respirométrica se verificó que la concentración de los sustratos amonio y acetato utilizados en el análisis fuesen saturantes para el lodo F de manera de asegurar que las medidas correspondieran realmente a una actividad potencial (velocidad máxima de consumo de oxígeno frente al agregado de un sustrato, ya que se midió en condiciones óptimas de temperatura, pH, aireación y de concentraciones de sustrato). Para ello se construyeron curvas de saturación con concentraciones crecientes de sustrato y se midió la actividad respirométrica en cada caso (Fig. 13).

Se observó que la velocidad oxidante de amonio sigue una cinética tipo Michaelis-Menten. La concentración de saturación determinada fue de aproximadamente 11 ppm N-NH_4^+ , aunque luego la actividad disminuyó y volvió a aumentar con 60 ppm N-NH_4^+ (Fig. 13). El valor de saturación para el amonio que se encuentra en la bibliografía es de 15 ppm N-NH_4^+ (Gorska et al., 1996).

La composición microbiana de cada lodo influye en este valor, ya que diferentes especies de AOB tienen distinta afinidad por el amonio. Por lo tanto se debería determinar la concentración saturante de amonio para cada lodo. Las concentraciones de amonio mayores a 200 ppm podrían inhibir la flora nitrificante. Debido a las razones mencionadas anteriormente se estableció 60 ppm N-NH_4^+ como concentración a utilizar en los ensayos de actividad potencial ya que se verificó que era saturante.

La oxidación del acetato siguió una cinética del mismo tipo, donde se verificó que la concentración de DQO agregada (200 ppm DQO-acetato) era saturante para ese lodo. No se determinó la concentración de saturación de nitrato. La concentración utilizada para el ensayo de actividad oxidante de nitrato fue 10 ppm N-NO_2^- sugerida por los métodos de análisis del proyecto EOLI y por la bibliografía (Cabezas, 2005).

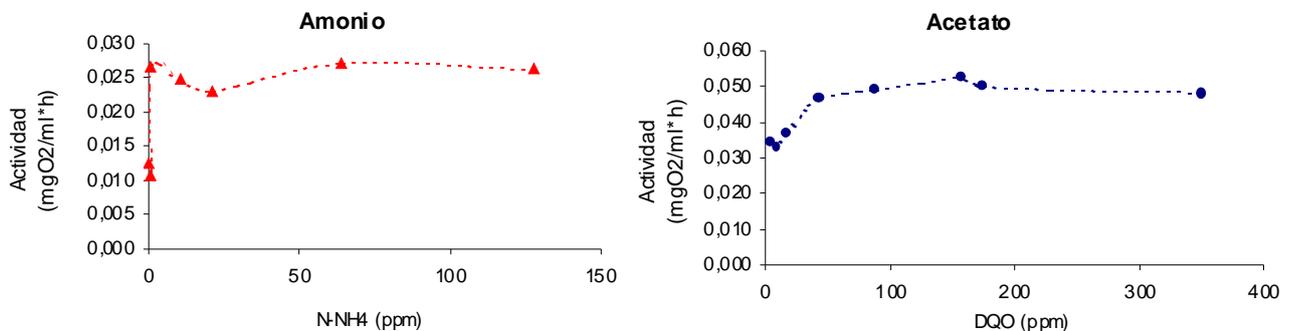


Figura 13. Curvas de saturación de amonio y acetato para el lodo F. Para el ensayo de actividad potencial se utilizaron 60 ppm de N-NH_4^+ y 200 ppm de DQO-acetato

Determinación de las actividades respirométricas en muestras del reactor F tomadas a lo largo de dos años.

Para estudiar los cambios en el reactor se dividió el período de operación en 5 etapas (Fig 2).:

Etapa I: start-up o arranque del reactor.

Etapa II: período luego de la reinoculación con sedimento de laguna anaerobia.

Etapa III: período luego de la introducción de tóxicos (Aliltiourea, y 4-clorofenol).

Etapa IV: período luego del cambio en el ciclo de operación, ciclo II.

Etapa V: período luego de la segunda reinoculación con sedimento de laguna.

A pesar de que los datos de actividad no presentaron distribución normal (según test Shapiro-Wilk con alfa 0.05; oxidante de amonio $p(\text{normal}) = 0.00605$; oxidante de nitrito $p(\text{normal}) = 0.00052$; heterótrofa $p(\text{normal}) = 0.03215$) se realizaron análisis de estadística descriptiva para comparar los resultados obtenidos de las actividades entre las distintas etapas.

Para las actividades respirométricas de AOB y heterótrofas (Fig. 14) la etapa I presentó los valores máximos de actividad, sin embargo resultó la etapa mas variable lo que se ve reflejado en los valores de desviación estándar (Tabla V). Si se observa la tendencia (Fig. 14) puede deducirse que en la etapa I la inestabilidad del lodo resultó en la caída abrupta (día 60) de las tres actividades (amonio, nitrito y acetato) coincidiendo con el aumento anormal de sólidos en el reactor provenientes del influente (laguna anaerobia).

En los tres casos luego de la reinoculación (etapa II) la actividad aumentó y permaneció estable con medias de 406, 146, y 764 mgO₂/gSSV.d para la actividad oxidante de

amonio, de nitrito y heterótrofa respectivamente. Estos resultados sugieren que la decisión de inocular el reactor fue acertada ya que mejoró la estabilidad y performance. Probablemente, durante la reinoculación ingresaron microorganismos activos provenientes de la laguna de tratamiento, los cuales lograron adaptarse a las condiciones de operación del reactor de laboratorio. Durante la etapa III (luego del agregado de tóxicos) las actividades presentaron medias aritméticas menores que en la etapa II (Tabla V). Sin embargo al final de la etapa II ya se observaba esta tendencia, por lo que, no se pudo concluir que esta disminución fuera consecuencia del agregado de tóxicos. Durante un ensayo previo de inhibición con aliltiourea, inhibidor específico de las bacterias AOB, realizado en batch (no en el reactor sino con una muestra en el laboratorio) se observó una recuperación del 100% de la actividad oxidante de amonio (población sensible al inhibidor aliltiourea) luego de 24h. de su agregado (ANEXO 7). Por lo tanto, como era de esperar, la inhibición por aliltiourea en el reactor F fue reversible y la actividad de las bacterias oxidantes de amonio se recuperó rápidamente (Fig. 14).

En cuanto a la actividad heterótrofa en la etapa III, se observó una disminución en los valores de media, mínimo y máximo, lo cual podría adjudicarse al agregado de tóxicos, en este caso al clorofenol, que inhibe la flora microbiana en general. Sin embargo, luego del agregado de este tóxico (clorofenol) la actividad comenzó a aumentar observándose una clara pendiente positiva. Esto indicó que la flora heterótrofa, si bien es afectada inmediatamente luego de la entrada de tóxicos provenientes del influente, posee capacidad de recuperación una vez que el tóxico ya no está presente en el lodo.

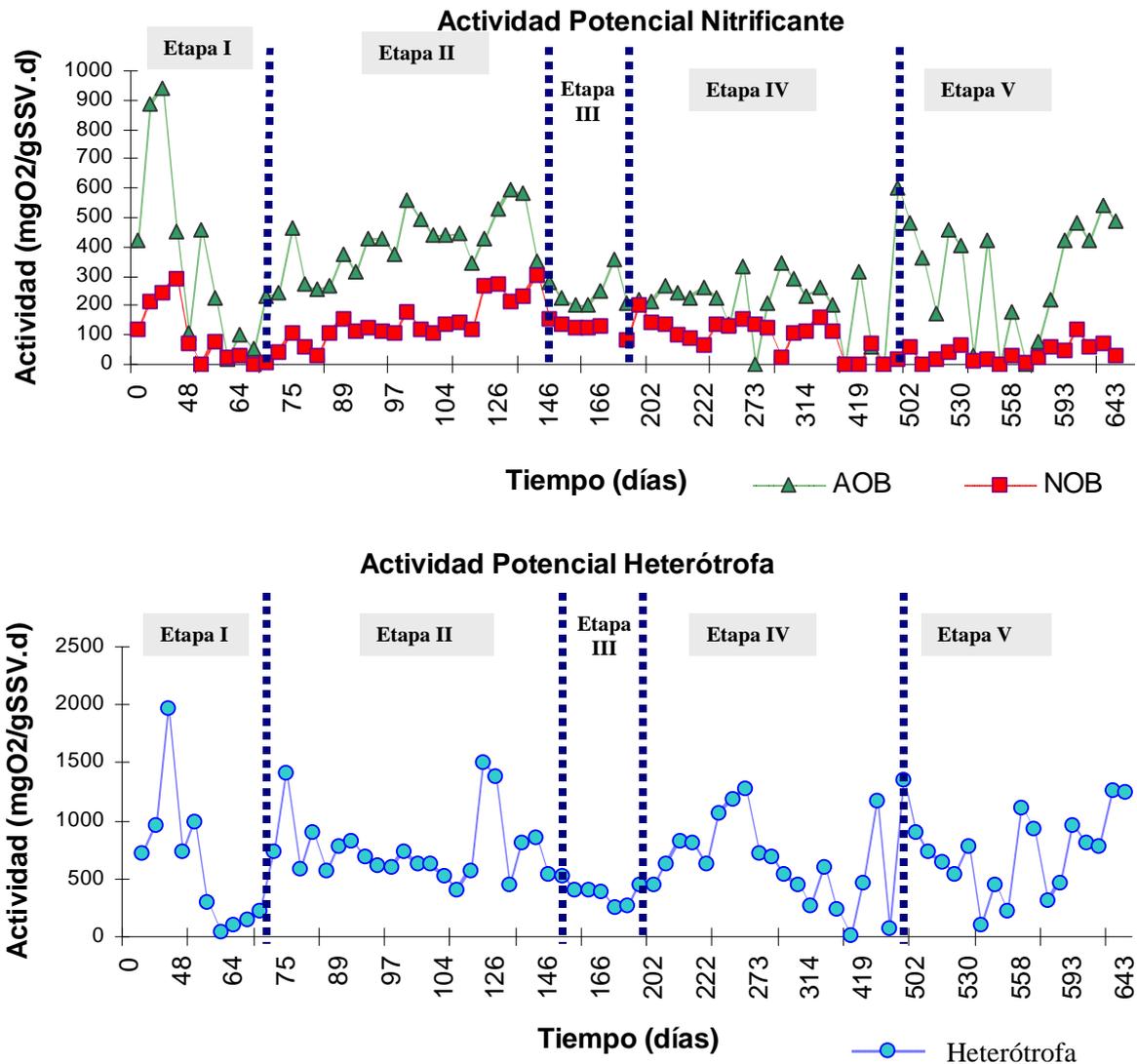


Figura 14. Actividad potencial vs tiempo de operación del reactor F. **A:** actividad nitrificante de AOB y NOB; **B:** actividad heterótrofa. Se indican las cinco etapas del periodo de operación del sistema.

La aplicación del nuevo ciclo de operación, con cambios en los tiempos de cada ciclo, (Etapa IV) favoreció la actividad heterótrofa en cuanto al valor de la media (631 mgO₂/gSSV.d, Tabla V) con respecto a la etapa anterior. Sin embargo, dentro de esta etapa se podrían distinguir dos subetapas. La primera (SE1) que corresponde al período entre el día 191 hasta el día 273 y la segunda (SE2) a partir del día 273 hasta el día 335 aproximadamente. En la SE1 se observó una pendiente positiva (pendiente = + 12,675) lo que indicó una fuerte tendencia al aumento de actividad. Debido a que las bacterias desnitrificantes en general tienen también la capacidad de oxidar acetato utilizando

oxígeno como aceptor final de electrones, es de esperar que la biomasa heterótrofa este compuesta por bacterias desnitrificantes y bacterias que oxidan acetato solamente en condiciones aerobias. Se podría suponer entonces, que en esta subetapa la disminución del tiempo de aireación favoreció la flora desnitrificante heterótrofa. Por lo tanto el aumento de la actividad heterótrofa de la SE1 podría corresponder a dicho grupo bacteriano.

Sin embargo en la SE2 se observó una notable disminución de la actividad, observándose una pendiente negativa (pendiente = -9,9592) y luego del día 335 las medidas de actividad resultaron muy variables hasta el final de la etapa. Estas variaciones podrían deberse a factores externos (por ejemplo a fallas del sistema de control del reactor, entrada de tóxicos en el influente proveniente de la laguna anaerobia) o internos (cambios en la estructura de la comunidad por sucesión natural de especies, etc.) que no pudieron comprobarse pero no se deben descartar.

Por otro lado, se observó una leve disminución en la pendiente de la actividad oxidante de nitrito en la etapa IV la que continuó disminuyendo durante la etapa V. Sugiriendo que la disminución de la duración de la etapa aerobia pudo afectar negativamente a las NOB. De todas formas para la eficiencia de remoción de nutrientes esto no sería un problema, ya que la oxidación de amonio a nitrito permaneció activa, y la etapa de desnitrificación podría darse vía nitrito (Mulder y Kempen, 1997; Kempen et al., 2001)

Tabla V. Valores descriptivos de los estadísticos básicos de la actividad respirométrica del lodo F. Los valores de media, mínimo, máximo y desviación estándar se expresan en mgO₂/gSSV.día. N: número de muestras analizadas

Actividad oxidante de amonio					
	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa IV</i>	<i>Etapa V</i>
N	11	22	6	20	18
Media	355	406	240	202	320
Desviación estándar	318	107	60	108	198
Mínimo	18	246	201	0	0
Máximo	940	595	357	346	599
Actividad oxidante de nitrito					
	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa IV</i>	<i>Etapa V</i>
N	11	22	5	20	18
Media	98	146	121	100	38
Desviación estándar	106	73	21	58	31
Mínimo	0	31	84	0	0
Máximo	294	305	139	204	117
Actividad heterótrofa					
	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa IV</i>	<i>Etapa V</i>
N	10	22	6	20	18
Media	620	764	379	631	759
Desviación estándar	596	303	99	356	362
Mínimo	46	409	260	14	107
Máximo	1973	1510	526	1279	1348

CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD RESPIROMETRICA Y LA EFICIENCIA DE REMOCIÓN DEL REACTOR F

Se intentó determinar cual era la relación entre la actividad respirométrica y la eficiencia de remoción de nutrientes dentro del reactor F (utilizando los datos de remoción de nutrientes obtenidos en la Facultad de Ingeniería).

En este caso, como era de esperar, la actividad potencial heterótrofa reflejó los cambios ocurridos en la eficiencia de remoción de DQOs (Demanda Química de Oxígeno soluble), sin embargo el DQO (total) no se correlacionó con DQOs ni con la actividad heterótrofa (Tabla VI).

Por otro lado la actividad oxidante de nitrito reflejó los cambios de eficiencia de remoción de N-NH₄⁺ y Nt en el reactor (Tabla VI).

Sin embargo, la actividad oxidante de amonio (que presentó correlación con la actividad oxidante de nitrito) no reflejó los cambios en la eficiencia de remoción de $N-NH_4^+$ y Nt. Es decir que a pesar de que la actividad potencial varió durante todo el monitoreo, el porcentaje de eficiencia de remoción de nitrógeno se mantuvo alto y estable. Esto podría deberse a el hecho de que la actividad medida es potencial, es decir la velocidad

Tabla VI: matriz de correlación entre la actividad potencial respirométrica y la eficiencia de remoción del reactor. Triangulo superior: probabilidad de que las columnas NO esten correlacionadas. Triangulo inferior: Valores de correlacion r de Pearson's. Pearsons =1 hay correlacion. alfa = 0,05. DQO= eficiencia de remoción de DQO; Nt= Eficiencia de remoción de Nt; $N-NH_4$ = eficiencia de remoción de amonio.

	AOB	NOB	ACETATO	DQOt	DQOs	NT	N-NH4
AOB		0,0375981	0,0566311	0,611717	0,365861	0,754921	0,619606
NOB	0,39481		0,19611	0,757176	0,682081	0,0412862	0,0420479
ACETATO	0,364346	0,251822		0,659825	0,0241868	0,889174	0,811056
DQOt	-0,100261	-0,0611655	0,0869894		0,144542	0,441992	0,20041
DQOs	0,177622	-0,0809763	0,424948	0,28297		0,148482	0,498724
NT	-0,0617512	0,388076	0,0275874	0,151356	-0,280334		1,6951E-7
N-NH4	0,0980565	0,386745	0,0473105	0,249497	-0,133353	0,810679	

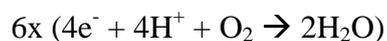
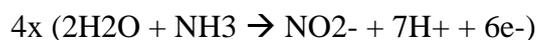
máxima que tiene el lodo en condiciones óptimas. Por lo tanto podría ocurrir que aún cuando la actividad potencial es mínima, la misma es suficiente para remover el 100 % del nitrógeno que ingresa en el influente.

Tabla VI. Matriz de correlación entre la actividad potencial respirométrica y la eficiencia de remoción del reactor. Triangulo superior: probabilidad de que las columnas NO estén correlacionadas. Triangulo inferior: Valores de correlación r de Pearson's. Pearsons =1 existe correlación. alfa = 0,05. DQO= eficiencia de remoción de DQO (t = total y s = soluble); Nt= Eficiencia de remoción de Nt; $N-NH_4$ = eficiencia de remoción de amonio; AOB: actividad oxidante de amonio, NOB: actividad oxidante de nitrito; Acetato: actividad heterótrofa.

	AOB	NOB	ACETATO	DQOt	DQOs	NT	N-NH4
AOB		0,0375981	0,0566311	0,611717	0,365861	0,754921	0,619606
NOB	0,39481		0,19611	0,757176	0,682081	0,0412862	0,0420479
ACETATO	0,364346	0,251822		0,659825	0,0241868	0,889174	0,811056
DQOt	-0,100261	-0,0611655	0,0869894		0,144542	0,441992	0,20041
DQOs	0,177622	-0,0809763	0,424948	0,28297		0,148482	0,498724
NT	-0,0617512	0,388076	0,0275874	0,151356	-0,280334		1,6951E-7
N-NH4	0,0980565	0,386745	0,0473105	0,249497	-0,133353	0,810679	

Para demostrar esta hipótesis se procedió a expresar los datos de actividad nitrificante en $mgN-NH_4^+$ /hora y calcular la mínima concentración de amonio que pudo remover el reactor F en cada ciclo.

Para ello se tuvieron en cuenta las siguientes ecuaciones químicas de oxidación de amonio:



Simplificando, se llega a la siguiente reacción:

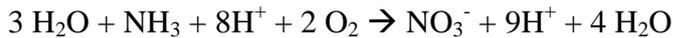
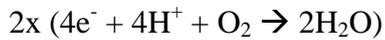


Por lo tanto para oxidar dos moles de **NH₃ (28g)** se necesitan tres moles de **O₂ (96g)**, lo que significa que el factor de conversión de mgO₂ a mgN-NH₄⁺ consumidos en la oxidación del amonio hasta nitrito es: $96\text{gO}_2/28\text{gN-NH}_3 = \mathbf{3,43 \text{ gO}_2/\text{gN-NH}_3}$

Sin embargo, en la bibliografía está reportado un factor de conversión menor al calculado (**3,24 gO₂/gN-NH₃**). Este factor toma en cuenta el carbono inorgánico (HCO₃⁻) que utilizan las bacterias AOB autótrofas para su crecimiento celular y es menor al calculado ya que el compuesto carbonado funciona además como agente oxidante, razón por la cual se consume menos oxígeno para oxidar el amonio (Henze et al., 1997).

Ambos valores se utilizaron para transformar los datos de manera de comparar resultados. Sin embargo, este último no sería el valor adecuado para este caso, ya que la actividad respirométrica se lleva a cabo en condiciones de no crecimiento, es decir en tiempos menores al tiempo de duplicación celular de las AOB.

Se llevó a cabo el mismo razonamiento pero para calcular el oxígeno requerido para oxidar el amonio hasta nitrato, es decir para la nitrificación completa.



Simplificando la ecuación anterior se llega a la siguiente reacción:



Por lo tanto en este caso para oxidar un mol de **NH₃ (14g)** se necesitan dos moles de **O₂ (64g)**, lo que significa que el factor de conversión de mgO₂ a mgN-NH₄ consumidos en la oxidación del amonio hasta nitrato es: $64\text{gO}_2/14\text{gN-NH}_3 = \mathbf{4,57 \text{ gO}_2/\text{gN-NH}_3}$

De la misma forma que se explicó anteriormente se encontró en la bibliografía el factor de conversión **4,25 gO₂/gN-NH₃** que toma en cuenta el carbono inorgánico utilizado por las bacterias AOB y NOB autótrofas para su crecimiento (Henze et al., 1997). Estos factores también fueron utilizados para transformar los valores de actividad en mgN-NH₄ consumidos en el tiempo por unidad de biomasa a modo de comparar resultados.

Se transformaron los valores de la media, los mínimos y los máximos de actividad oxidante de amonio y de actividad nitrificante (la suma de los valores de actividad oxidante de amonio y oxidante de nitrito) para cada etapa utilizando los factores descritos anteriormente (Tabla VII). Se calculó la actividad por hora, para calcular la capacidad potencial de remoción de N-NH₄⁺ por unidad de volumen de lodo, considerando el tiempo de aireación por ciclo ya que la reacción planteada es aerobia.

Tabla VII: datos de actividad potencial oxidante de amonio y nitrificante transformados a desde $\text{mgO}_2/\text{gSSV}.\text{día}$ a $\text{mgNH}_4^+/\text{L}.\text{hora}$

DATOS TRANSFORMADOS tomando en cuenta <i>C_{inorg}</i>										
mgN-NH ₄ /L.hora										
	Actividad oxidante de amonio					Actividad nitrificante (suma AOB y NOB)				
	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa IV</i>	<i>Etapa V</i>	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa IV</i>	<i>Etapa V</i>
Media	6840	7829	4625	3900	6175	6661	8113	5305	4440	5262
Mínimo	352	4739	3881	0	0	269	4064	4198	0	0
Máximo	18135	11474	6879	6676	11550	18151	13235	7281	8088	10532

DATOS TRANSFORMADOS sin tomar en cuenta <i>C_{inorg}</i>										
mgN-NH ₄ /L.hora										
	Actividad oxidante de amonio					Actividad nitrificante (suma AOB y NOB)				
	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa IV</i>	<i>Etapa V</i>	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa IV</i>	<i>Etapa V</i>
Media	6461	7396	4369	3684	5833	6194	7545	4933	4129	4893
Mínimo	333	4476	3666	0	0	250	3780	3904	0	0
Máximo	17130	10839	6498	6306	10910	16880	12308	6772	7522	9794

Los valores mínimos de actividad potencial de remoción de amonio durante toda la operación fueron (excepto en casos puntuales de las etapas IV y V donde hubo muestras en las que no se detectó actividad) :

269 mgN-NH₄⁺/litro.hora: mínimo de remoción de amonio en nitrato tomando en cuenta el carbono inorgánico presente.

250 mgN-NH₄⁺/litro.hora: mínimo de remoción de amonio en nitrato sin tomar en cuenta el carbono inorgánico presente.

Si consideramos 250 mgN-NH₄⁺/litro.hora como la velocidad mínima de remoción de amonio por unidad de volumen, entonces en los 15 litros del reactor la velocidad mínima fue:

$$250 (\text{mgN-NH}_4^+/\text{L}.\text{h}) \times 15 (\text{L}) = \mathbf{3750 (\text{mgN-NH}_4^+/\text{h})}$$

El influente contenía 83 mgN-NH₄⁺/L y el reactor fue alimentado con 4 L del mismo, por lo tanto la carga de amonio que ingresó en cada ciclo fue de **332 mgN-NH₄⁺**.

Es decir que con la actividad potencial mínima registrada durante todo el monitoreo, se necesitarían $(332\text{mgN-NH}_4^+/3750\text{mgN-NH}_4^+/\text{h})$ 0,0885 horas de aireación por cada ciclo (aproximadamente 5,3 minutos) para remover el 100% de la carga de amonio. Probablemente es por ello que las variaciones de actividad potencial nitrificante no se reflejaron en los valores de eficiencia de remoción de NH_4^+ y Nt en el reactor, donde a pesar que la actividad potencial bajó en algunos momentos igualmente fue suficiente para remover la carga de amonio que ingresaba al reactor.

Sin embargo el tiempo de remoción total (5,3 min.) podría no ser exactamente el calculado, ya que el cálculo se basa en medidas que corresponden a la velocidad máxima (actividad potencial) que supone condiciones óptimas (temperatura, pH, concentración de sustratos, etc), que probablemente no fueran las condiciones reales del reactor. Según los datos obtenidos por medidas directas en el reactor (suministrados por Departamento de Ingeniería de Reactores de la Facultad de Ingeniería-UDELAR) la remoción completa de amonio ocurrió habitualmente en las primeras 1 a 1,5 horas durante el período de aireación de cada ciclo. Este tiempo fue mayor al calculado a pesar de que la concentración de amonio en el reactor fue superior a la de saturación (aproximadamente 22 ppm N-NH_4^+ luego de agregar 4L de influente en 15L de volumen final) y las condiciones de pH y temperatura fueron las óptimas. Pero, a pesar de que el oxígeno disuelto (OD) se mantuvo en una concentración mayor a $3\text{mgO}_2/\text{L}$ (de acuerdo a las medidas dentro del reactor), pudo ocurrir que la transferencia de oxígeno a toda la biomasa fuera insuficiente. Cuanto mayor es el volumen del reactor, mas difícil es lograr una aireación homogénea, por lo que el oxígeno pudo no haber llegado a parte de la biomasa (por ejemplo la que se encuentra en el interior de cúmulos de bacterias). La deficiencia en la transferencia de oxígeno podría disminuir la velocidad de oxidación, en este caso de amonio.

Con los valores calculados se siguió otra línea de razonamiento planteando una nueva pregunta: **¿con la actividad potencial nitrificante mínima registrada, cual sería la mínima carga de amonio que puede remover el reactor en cada ciclo si las condiciones del reactor fuesen óptimas?**. La pregunta esta enfocada a evaluar la carga que soportaría el reactor en caso de aumentar el amonio en el influente.

Esta pregunta podría responderse con el siguiente cálculo:

Si la remoción potencial mínima de amonio fue de $3750 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{hora}$ en 15 L, en las 3 horas de aireación por ciclo se podría remover $11250 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{ciclo}$. Teóricamente, esta sería la mínima carga de amonio que el reactor podría remover en cada ciclo (ciclo tipo II). Como se alimentó el reactor con 4 L de influente, el mismo podría haber contenido **$2812 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{L}$** .

Cabe destacar que a pesar de tratarse de cálculos realizados en base a resultados experimentales, por el hecho de tratarse de procesos biológicos con interacciones que aún se desconocen, los valores de carga calculados deberían confirmarse experimentalmente en el reactor.

5.1.2. Actividad desnitrificante del reactor F

Si bien la actividad desnitrificante en el período de operación desde el día 427 al día 552 presentó una media de $6025 \text{ umolesNO}_3^-/\text{gSSV.día}$, la actividad fue muy variable (desviación estándar = $2398 \text{ umolesNO}_3^-/\text{gSSV.día}$).

Se descartó la posibilidad de que la medida de consumo de NO_3^- (del ensayo de actividad desnitrificante) sea debido al proceso de biosíntesis ya que no hay crecimiento durante el período de medida de actividad (1 a 2 hs), por lo tanto la biosíntesis es

mínima o nula. Además, se descartó que el consumo de NO_3^- se deba al proceso de amonificación ya que no se detectó un aumento del NH_4^+ durante el ensayo .

La actividad desnitrificante presentó la misma tendencia que la actividad heterótrofa (Fig. 15). Se demostró que existe correlación entre ambas actividades (el índice de correlación r de Pearson's y p (probabilidad de que las variables no estén correlacionadas) 0,87 y 0,001 respectivamente con un alfa de 0,05).

Este resultado sugiere que la mayor parte de la flora heterótrofa presente en el reactor era desnitrificante (por ello la correlación entre ambas). Para comparar los valores de ambas actividades se deberían transformar los datos expresando ambas actividades como la velocidad de consumo de acetato. Sin embargo la velocidad de oxidación de acetato con O_2 como aceptor muy probablemente difiera de la velocidad de oxidación de acetato cuando el aceptor de electrones es el NO_3^- ya que se trata de distintas vías enzimáticas, y por supuesto, se trata de distintas técnicas de medida con errores asociados diferentes. Por lo tanto no se pueden comparar los valores de ambas actividades pero si su tendencia.

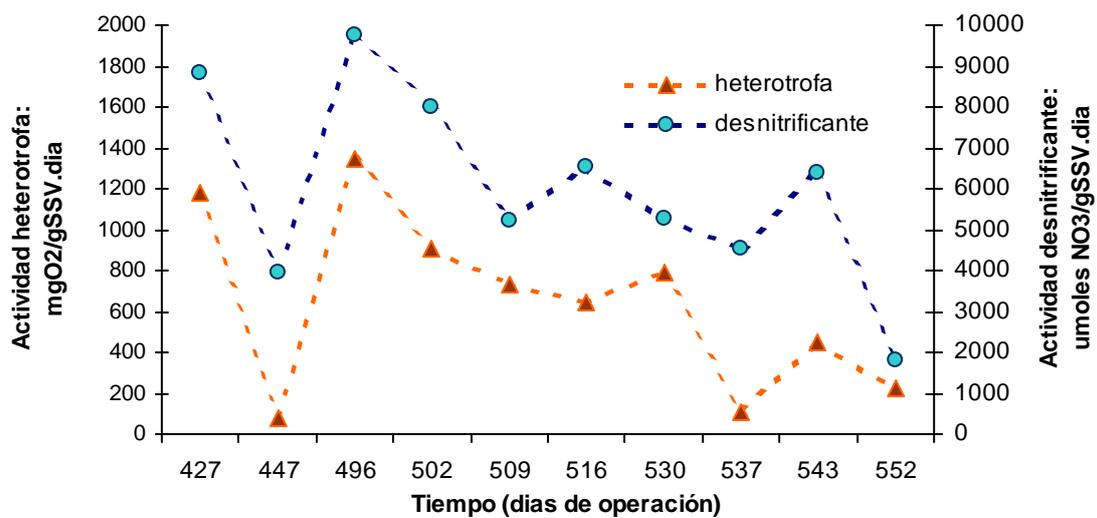


Figura 15. Gráfica de actividad desnitriicante (triángulos) y actividad heterótrofa (círculos) vs tiempo.

Sin embargo, solo por que exista una buena correlación no se puede afirmar que la mayoría de la flora heterótrofa este compuesta por bacterias desnitrificantes. Esta correlación podría deberse a la presencia de flora heterótrofa no desnitrificante que siga la misma tendencia que la flora desnitrificante o a que el ensayo de actividad en las condiciones que se realiza (utilizando acetato como dador de electrones) no detecte otros microorganismos heterótrofos aerobios presentes en el reactor que no utilicen acetato

5.1.3. Recuento por FISH

Se seleccionaron siete muestras tomadas en las diferentes etapas del reactor para monitorear la comunidad microbiana mediante FISH (tomadas en los días 35, 64, 89, 103, 126, 146, y 216).

Los resultados de FISH revelaron un bajo porcentaje (entre 30 a 60 %) de células que hibridaron con la sonda dirigida al dominio *Bacteria* (Eub338) con respecto al total de bacterias teñidas con DAPI. Indicando que el número de bacterias detectadas representa solo una pequeña fracción de los SSV de la biomasa del lodo (Fig. 16). De todas formas, cabe destacar que el total de bacterias resultó tres ordenes de magnitud mayor que los grupos analizados con sondas específicas.

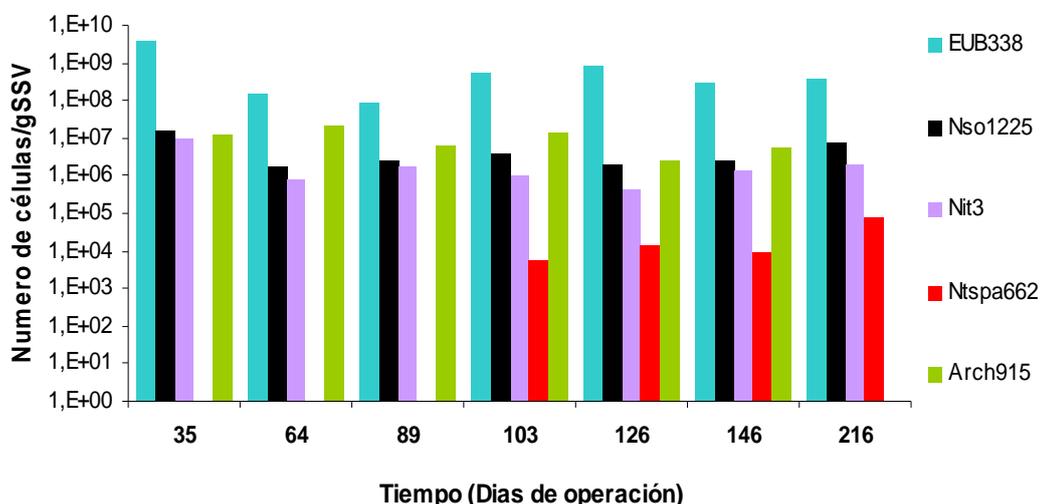


Figura 16. Gráfico que indica el monitoreo por FISH (número de células por unidad de biomasa) de los grupos microbianos: Bacteria (sonda EUB338), oxidantes de amonio (sonda Nso1225), oxidantes de nitrito (sondas Nit3 *Nitrobacter spp.* y Ntspa662 *Nitrospira spp.*), Archaea (sonda Arch915). Para los días 35 y 216 no se realizaron recuentos con Ntspa662 y Arch915 respectivamente.

Durante todo el monitoreo se detectó bacterias que hibridaron con la sonda dirigida a las bacterias oxidantes de amonio dentro del grupo beta-*Proteobacteria* (Nso1225) que se agrupaban formando cúmulos (Fig. 16). Estos resultados sugieren que la población de AOB se mantuvo dentro del reactor durante toda la operación. Las bacterias que hibridaron con la sonda dirigida al género *Nitrobacter* (oxidante de nitrito, sonda Nit3) también se mantuvieron en la misma proporción a lo largo de la operación, sin embargo solo fueron detectadas bacterias que hibridaron con la sonda dirigida al género *Nitrospira* (oxidante de nitrito, sonda Ntspa 662) a partir del día 103. Esto podría deberse al ingreso de bacterias de este género en el lodo de la laguna con que se reinoculó el reactor. Por lo tanto, la actividad oxidante de nitrito de los primeros 100 días de operación se podría deber exclusivamente a bacterias del género *Nitrobacter*. Durante todo el monitoreo se detectó células que hibridaron con la sonda dirigida al Dominio *Archaea* (sonda Arch915) (Fig. 16).

Relación entre la actividad y FISH

Al analizar el número de AOB y NOB por FISH y la actividad potencial nitrificante se observó que los cambios en la actividad no eran reflejados en el conteo por FISH realizado (Fig. 17). Esto se demostró realizando el análisis de correlación, donde la probabilidad de que ambos resultados no estuvieran correlacionados fue mayor a 0,05 (con $\alpha = 0,05$) (Tabla VIII). Esto podría deberse a dos razones principales. Una de ellas podría ser la subestimación de bacterias nitrificantes debido a la dificultad en el recuento de células dentro del flóculo nitrificante ya que se trata de una estructura tridimensional observada superficialmente. Ya ha sido reportado un mecanismo estimativo para calcular el volumen del flóculo y el volumen celular. A partir de ello se

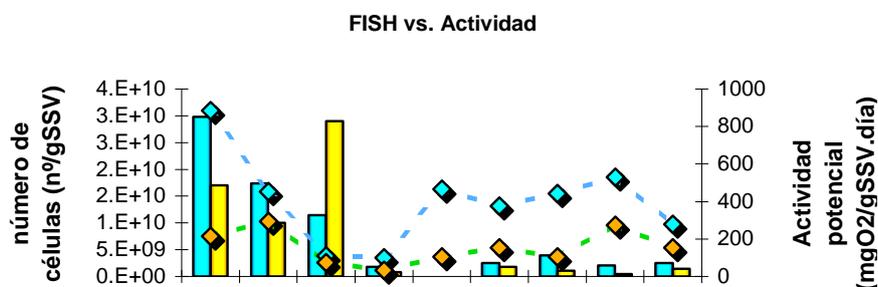
podría calcular el número de bacterias (Manser et al., 2005). Sin embargo, este mecanismo no es apropiado para lodos con gránulos densos e irregulares

La falta de correlación entre los resultados de FISH y la actividad también podría deberse a la presencia de microorganismos activos en el lodo que no son abarcados con las sondas seleccionadas para el FISH (obteniendo valores menores a los esperados). En este caso se estarían subestimando los microorganismos activos podrían aún no estar descritos o pertenecer a especies descritas pero no abarcadas por las sondas utilizadas. Un ejemplo de ello son las *Archaeas* recientemente reportadas como organismos capaces de llevar a cabo la nitrificación, posiblemente con un rol importante en ecosistemas terrestres y marinos las cuales no están abarcadas por la sonda (Park et al., 2006; Nicol y Schleper, 2006). Esto podría ser una explicación del alto número de *Archaeas* detectadas por FISH durante todo el monitoreo (sonda Arch915;Fig. 4)

Por otro lado, la herramienta FISH podría sobreestimar el número de células activas en algunos casos. Por ejemplo debido a la presencia de microorganismos no activos que conservan sus ribosomas y que por lo tanto son detectados por FISH y no por respirometría. Esto ya ha sido reportado para algunas bacterias oxidantes de amonio (Schramm et al., 1999).

Tabla VIII. Análisis de correlación entre la actividad potencial nitrificante y el conteo de AOB y NOB por FISH entre los días de operación 13 y 146 del lodo F. $p(\text{uncorr}) = \text{probabilidad de que no exista correlación con } \alpha = 0.05$

Actividad potencial	FISH	p (uncorr)
Actividad AOB	Nso1225	0.08
Actividad NOB	Nso1225	0.35
Actividad AOB	Nit3	0.98
Actividad NOB	Nit3	0.85



Cálculo de la actividad oxidante de amonio por célula de AOB

Se calculó para cada fecha la actividad teórica por célula de AOB. Para ello se dividió la actividad oxidante de amonio ($\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{día}$) entre el número de AOB proveniente del conteo por FISH (número de AOB/gSSV) para cada fecha analizada. Luego este valor fue transformado de mgO_2 a mgN-NH_4^+ consumidos, a partir de los factores de conversión 3,24 (teniendo en cuenta el carbono inorgánico presente) y 3,43 (teniendo en cuenta solo el oxígeno). La actividad celular oxidante de amonio resultó en promedio $3,3 \times 10^{-5} \text{ mgN-NH}_4^+/\text{celula}\cdot\text{día}$ y $3,1 \times 10^{-5} \text{ mgN-NH}_4^+/\text{celula}\cdot\text{día}$ respectivamente (Tabla IX).

Tabla IX. Actividad oxidante de amonio hasta nitrito calculada por célula de AOB durante los primeros 216 días.

Tiempo días	con Cinorg	sin Cinorg
	Actividad oxidante de amonio $\text{mgN-NH}_4/\text{cel}\cdot\text{día}$	Actividad oxidante de amonio $\text{mgN-NH}_4/\text{cel}\cdot\text{día}$
35	8.1.E-06	7.6.E-06
64	1.7.E-05	1.6.E-05
89	4.6.E-05	4.4.E-05
103	3.4.E-05	3.3.E-05
126	8.0.E-05	7.5.E-05
146	3.4.E-05	3.2.E-05
216	9.8.E-06	9.2.E-06
Promedio	3.3.E-05	3.1.E-05

Los resultados de actividad oxidante de amonio calculada por célula en base al conteo de AOB mediante FISH y la actividad respirométrica fue notoriamente mayor a los valores reportados en la bibliografía (3.0×10^{-10} a $1.0 \times 10^{-8} \text{ mgN-NH}_4/\text{cél}\cdot\text{día}$ Feray,

2000). Esto podría estar relacionado a la posible subestimación en el recuento de AOB realizado por FISH con la sonda Nso1225. Tal como se explicó anteriormente, se han reportado nuevas especies capaces de realizar la nitrificación y que no están abarcadas por la sonda utilizada. Un ejemplo de ello son las *Arqueas* que podrían estar presentes y activas en el lodo pero que no serían detectadas por FISH con la sonda Nso1225 (Park et. al., 2006; Nicol y Schleper, 2006).

Otra causa de subestimación en el número de células nitrificantes podría ser debido a la disposición en flóculos de las AOB, ya que en estos casos fue necesario calcular el mismo en base a la observación superficial de flóculos (cuantificación de área de flóculos) y al área estimada por célula.

Por otro lado no se descartó la posibilidad de que la diferencia con los datos de bibliografía en la actividad por célula se debiesen a la presencia de diferentes especies con mayor actividad específica.

5.1.4. Aislamiento de cepas

Se aislaron 32 cepas del lodo F a lo largo de la operación del reactor. Se determinó la capacidad desnitrificante a 23 de ellas, donde 9 dieron resultados positivos al test de desnitrificación. (Tabla X). Una cepa (F10) fue capaz de consumir el NO_3^- sin embargo acumuló NO_2^- , por lo tanto no se consideró como desnitrificante

Tabla X. Cepas heterótrofas aerobias aisladas en medio TSA a partir del lodo F. B= Bastones; ch = chicos; C = cocos; CB = cocobacilos, Cat. = catalasa; Ox. = oxidasa; desn. = desnitrifica según la medida de consumo de NO_3^- el día de operación del reactor correspondiente al aislamiento

		Aislamientos en TSA			
Día	cepa	Gram	Cat.	Ox.	Desn.
419	F9	B -	-	-	Si
	F10	B ch +	+	-	no
	F11	B +	+	-	no
	F12	B ch -	-	+	Si
427	F13	B +	+	+	no
	F14	B -	+	-	no
	F15	B +	+	-	no
	F16	C -	+	-	no
	F17	Bch -	+	-	no
	F18	B -	-	+	Si
446	F19	B -	-	+	no
	F20	CB -	+	-	no
	F21	B -	-	-	no
	F22	B -	-	-	no
	F23	B -	+	+	Si
	F24	B -	+	+	Si
	F25	B +	+	-	Si
558	F26	B -	+	+	Si
	F27	B -	+	+	Si
	F28	B -	+	-	no
	F29	B -	-	+	Si
	574	F30	Bch -	+	-
F32		B -	+	+	no

Si bien este resultado no es suficiente como para determinar la proporción de bacterias desnitrificantes en el total de bacterias heterótrofas, se podría afirmar que dicha proporción es < 1 ($< 100\%$). Este dato (η_g , término menor a 1 que multiplica la expresión de Monod) es importante para el modelado de reactores en la ecuación que considera el crecimiento anóxico de bacterias heterótrofas:

$$r_2 = \left[\frac{S_s}{K_s + S_s} \right] \left[\frac{K_{O,H}}{K_{O,H} + S_O} \right] \left[\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right] \eta_g X_{B,H}$$

Donde r_2 = crecimiento anóxico de microorganismos heterótrofos

S_s = concentración de sustrato fácilmente degradable

K_s = constante de saturación de sustrato

$K_{O,H}$ = constante de saturación de oxígeno para microorganismos heterótrofos

S_{NO} = concentración de nitrato / nitrito

K_{NO} = constante de saturación de nitrato / nitrito

$X_{B,H}$ = concentración de biomasa heterótrofa

η_g = factor de corrección de velocidad de crecimiento anóxico de heterótrofos. El mismo considera la fracción de microorganismos heterótrofos capaces de utilizar nitrato como aceptor final de electrones y la variación de la velocidad de crecimiento en condiciones anóxicas.

El valor de η_g del modelo n° 1 ASM a 20°C es de 0.8, y en otros casos utilizan el factor 1.0 los cuales no deberían ser extrapolados al modelo de reactores SBR (Schmidell et al., 2007).

IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Se secuenció el gen ARNr 16S de cinco de las cepas aisladas y se obtuvo el porcentaje de similitud según la herramienta **Blast** (Basic Local Alignment Search Tool) con secuencias depositadas en el portal **NCBI** (National Center for Biotechnology Information) utilizando el banco de secuencias Gen Bank. Las cepas presentaron los siguientes valores de similitud con los microorganismos mas relacionados: **F10** 96 % con *Bacillus pumilus* (AY437612), **F25** 93% con *Bacillus cereus* (DQ058163), *B. thuringensis* (DQ206989) y *B. anthracis* (DQ232742), **F29** 90 % con *Pseudomonas* (*Pseudomonas mendocina* CP000680; *Pseudomonas fluorescens* CP000094; *Pseudomonas syringae* CP000075), **F24** 97% con *Ochrobactrum anthropi* (AJ867292) y **F26** 96% de similitud con *Ochrobactrum anthropi* (AJ867292) y *O. tritici* (AY972348).

Se determinó también la secuencia del gen de nitrito reductasa (*nirK*) de las cepas **F24** y **F26** (Fig. 18), los cuales presentaron 99% de similitud con secuencias depositadas de

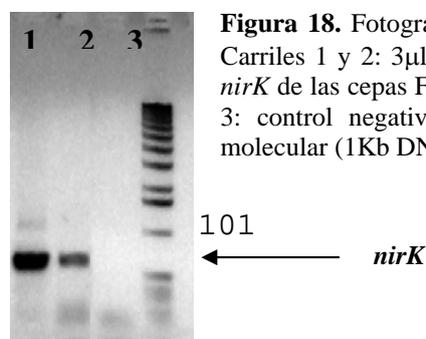


Figura 18. Fotografía de un gel de agarosa 0.8 %. Carriles 1 y 2: 3 μ l de la reacción de PCR del gen *nirK* de las cepas F24 y F26 respectivamente. Carril 3: control negativo. Carril 4: marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder).

nirK de aislamientos del género *Ochrobactrum*.

La presencia de organismos afiliados al género *Ochrobactrum* ha sido previamente reportada en reactores con capacidad de degradar compuestos recalcitrantes como varios clorofenoles entre ellos el 4-clorofenol (Muller et al., 1998). Este fue uno de los tóxicos utilizados en el reactor para evaluar la capacidad de recuperación de la biomasa. Además se ha reportado que microorganismos de las especies *Ochrobactrum intermedium* y *O. anthropi* son capaces de tolerar altas concentraciones de Cr(VI) y de reducir las diferentes formas del mismo (cromato y dicromato), entre otros metales pesados [Cd(II) y Cu(II)] (Ozdemir et al., 2003; Sultan y Hasnain, 2006). Esta capacidad podría ser utilizada en métodos alternativos para la remoción de metales pesados presentes en algunos residuos tanto sólidos como líquidos.

Otra de las cepas aisladas del reactor F que presentó capacidad desnitrificante (cepa F29) resultó estar relacionada con el género *Pseudomonas* según el análisis de la secuencia del gen del ARNr de 16S. Algunas especies de *Pseudomonas* son capaces de desnitrificar como por ejemplo *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas denitrificans* (Daum et al., 1998; Wang et al., 1995; Liu et al., 1998; Hamilton et al., 2005).

5.1.5. Análisis de la comunidad desnitrificante: T-RFLP y clonado del gen *nirS*

El monitoreo de la comunidad desnitrificante mediante T-RFLP del gen *nirS* se realizó hasta el día de operación 219 (Fig. 19). Se detectaron ocho picos (T-RFs) predominantes con la enzima *HhaI*, aunque su proporción relativa varió con el tiempo de operación del reactor (Fig. 20a). Estos resultados sugieren la presencia de una comunidad desnitrificante estable en el reactor F pero con diferentes predominancias a lo largo del tiempo.

Mediante el análisis con la enzima *MspI* se detectaron 11 T-RFs en total a lo largo del monitoreo (Fig. 20b) presentando mayor variación en el tiempo que lo ocurrido en el análisis con la enzima *HhaI*. Sin embargo, en este caso también se observó la presencia grupos dominantes presentes en casi todo el monitoreo como los T-RFs 169, 143, 140 y 101.

La flora desnitrificante se identificó mediante el análisis filogenético de secuencias obtenidas de una biblioteca de genes *nirS* (cd1-nitrito reductasa) a partir del ADN de la muestra del día 103. Se seleccionaron 31 clones para ser secuenciados de los cuales se obtuvo una buena secuencia (en cuanto a tamaño y calidad) de 14 clones. Las secuencias de *nirS* obtenidas se relacionaron filogenéticamente con secuencias de *nirS* de especies de los géneros *Thauera*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Paracoccus*, y *Dechloromonas* (Fig. 21) .

Se compararon las secuencias de *nirS* obtenidas a partir de la biblioteca de *nirS* (clones de *nirS*) y las obtenidas utilizando el portal NCBI (con el banco Gen Bank) con los picos obtenidos en el análisis de T-RFLP mediante el análisis “in silico” de las secuencias con enzimas restricción . Se logró asignar identidad a 4 picos del T-RFLP-*nirS* (análisis con la enzima *HhaI*) y 5 picos con la enzima *MspI* (Tabla XI) con una tolerancia 5 pb (en algunos trabajos previos se había sugerido un rango de tolerancia de 1,5 a 5,1 pb; Hoshino et al., 2005; Rich et al., 2003). Los resultados indicaron que los géneros mencionados anteriormente fueron los dominantes y permanecieron en el reactor durante todo el monitoreo.

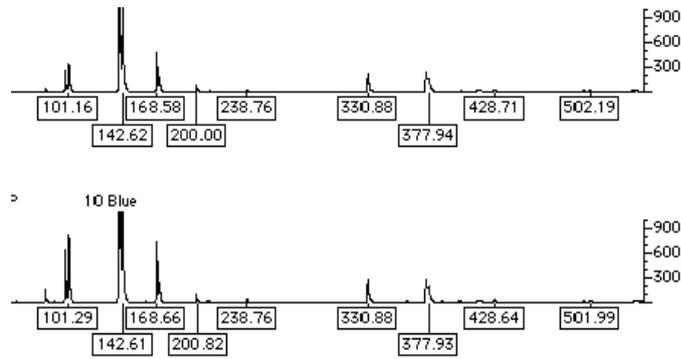


Figura 19. Electroferograma de T-RFLP del gen *nirS* con *MspI* de dos muestras del reactor F.

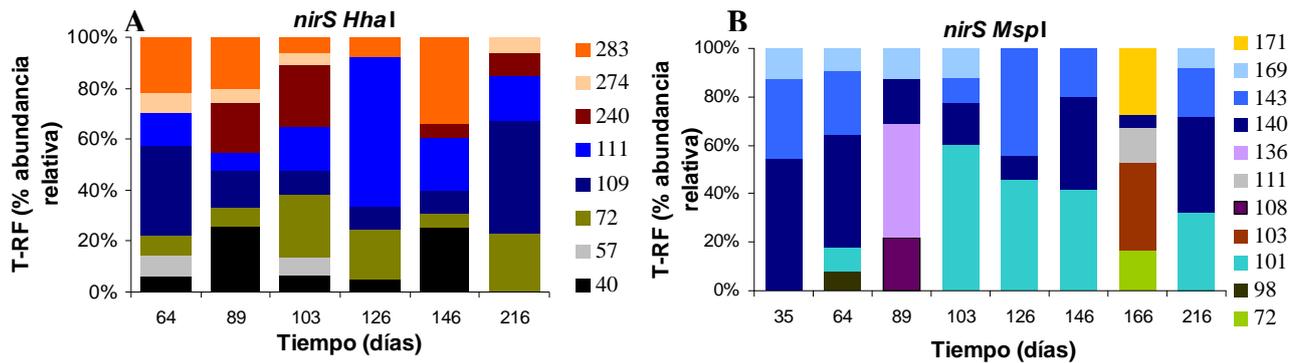


Figura 20. Análisis por T-RFLP del gen *nirS* de las muestras del lodo F durante 216 días de operación, con la enzima *HhaI* (A) y *MspI* (B). Un color = 1 T-RF

A partir de los datos de T-RFLP del gen *nirS* se analizó el efecto de las perturbaciones ocasionadas en la diversidad de microorganismos desnitrificantes del reactor. Todas las muestras presentaron un índice de diversidad H mayor al 80% de la diversidad máxima posible (H_{max}) de acuerdo al número de especies presentes, excepto la muestra del día 126 que presentó un 70 % de la diversidad máxima posible teniendo en cuenta todo el monitoreo. Además, esta muestra presentó los valores más bajos de diversidad (de Simpson y Shannon) teniendo en cuenta los resultados con ambas enzimas *HhaI* y *MspI* (Tabla XII).

Tabla XI. Comparación entre los T-RFs predominantes en el T-RFLP y los T-RFs predichos a partir del análisis in silico de las secuencias de *nirS* obtenidas a partir de la biblioteca de *nirS* del lodo F y de las secuencias depositadas en el banco de secuencias Gen Bank Los valores están expresados en pares de bases (pb)

	Tamaño calculado de T-RF*		T-RF en el T-RFLP	
	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>
<i>Paracoccus pantrophus</i> CAC03621	45	39	40	ninguno
<i>Paracoccus denitrificans</i> CAJ76797	45	39	40	ninguno
<i>Acidovorax</i> sp. AAL86942	70	100	72	101-103
<i>Azoarcus toluvorans</i> AAL86939	70	100	72	101-103
F30	112	174	109-111	171
F63	112	145	109-111	140-143
F5	112	103	109-111	103
F87	112	100	109-111	101-103
F88	112	100	109-111	101-103
F18	112	100	109-111	101-103
F3	112	100	109-111	101-103
F69	112	100	109-111	101-103
F94	112	100	109-111	101-103
F24	112	146	109-111	143
<i>Thauera aromatica</i> AAL86928	163	100	ninguno	101-103
F43	304	103	ninguno	101-103
F62	330	103	ninguno	101-103
<i>Thauera linaloolentis</i> AAL86934	355	100	ninguno	101-103
F42	441	142	ninguno	140-143

* calculado a partir de la secuencia de oligonucleótidos

TABLA XII. Cálculo de los índices de diversidad de las muestras del lodo F para los días de operación 35, 64, 89, 103, 126, 146, 166, y 216 a partir del análisis del T-RFLP *nirS* con *HhaI* (A), *MspI* (B) y del análisis conjunto de ambas enzimas (C). Las muestras correspondientes a los días 35 y 166 no pudieron analizarse con la enzima *HhaI* debido a problemas con la electroforesis del T-RFLP.

A	Indices de Diversidad de las muestras					
	64	89	103	126	146	216
Taxa S	7	7	8	5	6	5
Individuals	1201	1211	1268	1182	1243	1269
Dominance D	0.21	0.18	0.17	0.40	0.23	0.29
Shannon H	1.74	1.81	1.90	1.19	1.58	1.39
Simpson 1-D	0.79	0.82	0.83	0.60	0.77	0.71
Evenness e ^{H/S}	0.81	0.87	0.83	0.66	0.81	0.80

B	Indices de Diversidad de las muestras							
	35	64	89	103	126	146	166	216
Taxa_S	3	5	4	4	3	3	5	4
Individuals	519	635	566	584	616	643	746	750
Dominance_D	0.42	0.31	0.32	0.42	0.42	0.36	0.26	0.31
Shannon_H	0.96	1.36	1.26	1.10	0.94	1.05	1.45	1.26
Simpson_1-D	0.58	0.69	0.68	0.58	0.58	0.64	0.74	0.69
Evenness_e ^{H/S}	0.87	0.78	0.88	0.75	0.86	0.96	0.85	0.88

C	Indices de Diversidad de las muestras							
	35	64	89	103	126	146	166	216
Taxa_S	12	11	12	8	9			9
Individuals	1836	1777	1852	1798	1886			2019
Dominance_D	0.13	0.12	0.12	0.22	0.14			0.16
Shannon_H	2.25	2.26	2.27	1.75	2.04			2.00
Simpson_1-D	0.87	0.88	0.88	0.78	0.86			0.84
Evenness_e ^{H/S}	0.79	0.87	0.81	0.72	0.86			0.82
Hmax	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48			2.48
H/Hmax*100	91	91	91	70	82			81

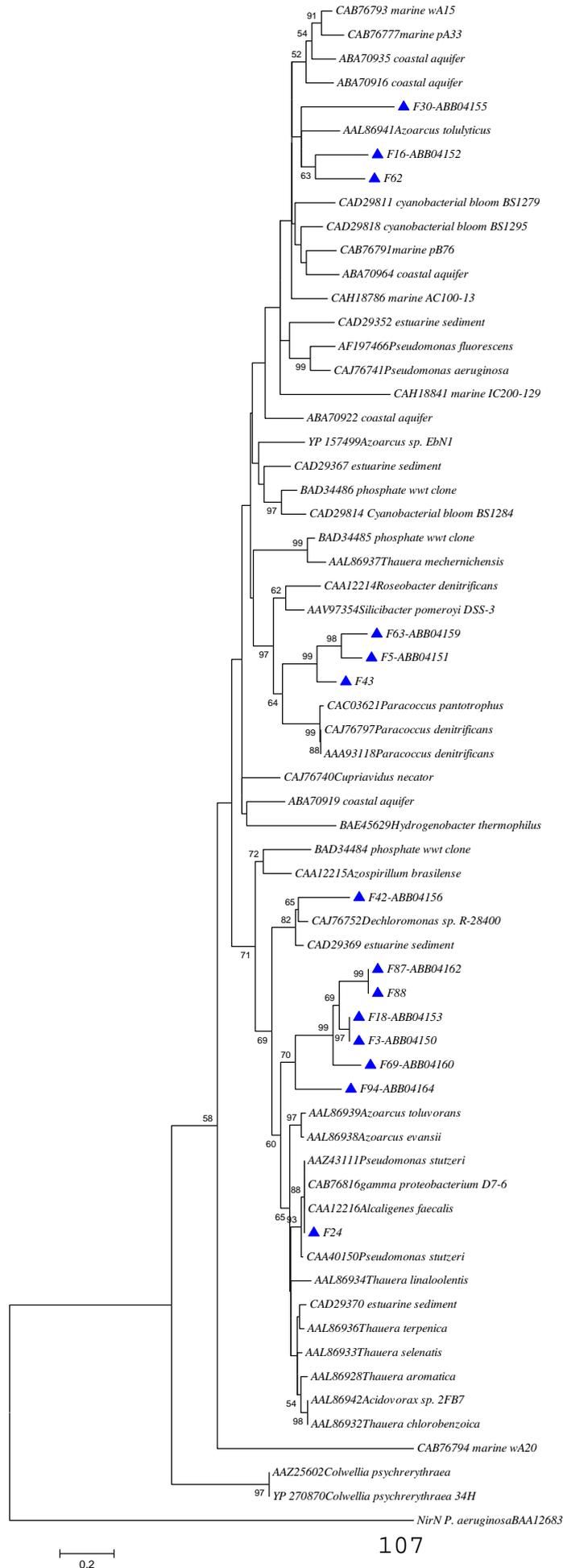


Figura 21. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales de 119 aminoácidos del gen *nirS* basado en el análisis neighbor-joining con el modelo matricial de Dayhoff. Barra = diferencia de 20 aminoácidos en 100. Se presentan valores de bootstrap mayores o 50 en 100 réplicas.

Se realizó una análisis de correlación entre la diversidad de la comunidad desnitrificante teniendo en cuenta el resultados de ambas enzimas y los valores promedio de las actividades heterótrofa, oxidante de amonio y de nitrito. Esto resultó útil para responder la pregunta planteada en cuanto a conocer si los cambios en la diversidad influyen en la actividad del lodo.

Mediante estos análisis se demostró que la diversidad de la comunidad desnitrificante se mantuvo relativamente estable, y aún cuando se produjeron pequeños cambios en la diversidad, estos no influyeron en la actividad del lodo (Tabla XIII)

Tabla XIII. Matriz de correlación **r** de Pearson's (abajo) y **p** (probabilidad de no correlación, arriba) entre los índices de diversidad del gen *nirS* con ambas enzimas *HhaI* y *MspI* y los resultados de actividad potencial respirométrica (Heterótrofa, AOB y NOB) en el lodo F para los días de operación 64, 89, 103, 126, 146, y 216 , con alfa = 0.05.

	Dominance_I	Shannon_H	Simpson_1-I	heterotrofa	AOB	NOB
Dominance_I		0,00224206	1,49989E-20	0,688838	0,845645	0,889049
Shannon_H	-0,961085		0,00224206	0,521739	0,751236	0,817107
Simpson_1-I	-1	0,961085		0,688838	0,845645	0,889049
heterotrofa	0,210553	-0,330921	-0,210553		0,0298152	0,0632678
AOB	0,10327	-0,167406	-0,10327	0,855491		7,92019E-5
NOB	0,0741031	-0,122542	-0,0741031	0,786919	0,992725	

Por otra parte se realizaron análisis multivariados a partir de los resultados de ambas enzimas con el programa PAST (Hammer et al., 2006). El objetivo fue obtener el grado de similitud entre las muestras y poder explicar las variaciones en la comunidad microbiana (si las hay) con los cambios ocasionados durante la operación (variables externas) o conocer simplemente si se debió a que las muestras poseen autocorrelación temporal (es difícil lograr independencia temporal ya que se trata de organismos vivos y el tiempo podría ser un factor de diferenciación en la comunidad). Para ello se utilizaron tres metodologías: el análisis de cluster, el análisis de escalado multidimensional

(MDS), y el análisis de componentes principales (PCA, Principal Components Analysis)

ANÁLISIS DE CLUSTER

Se realizó el análisis conjunto de los resultados con ambas enzimas (*HhaI* y *MspI*) y por separado el análisis con *MspI* ya que el mismo involucró mayor número de muestras. Los resultados obtenidos a partir de los índices de similitud Sorensen Dice y Morisita fueron útiles para representar los cambios en la comunidad en el tiempo (Fig. 22).

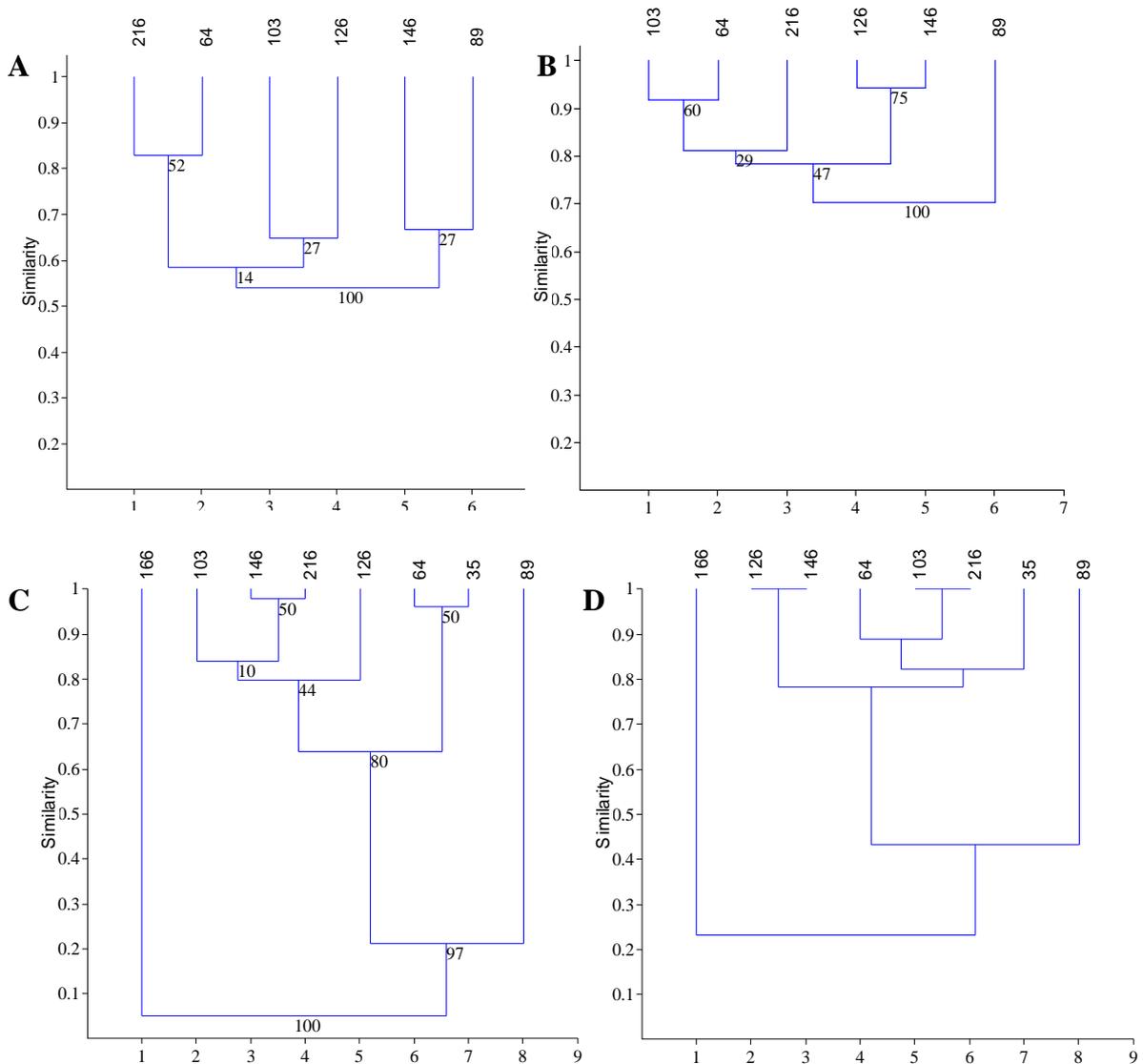


Figura 22. Análisis de cluster de las muestras del reactor F utilizando el método de agrupamiento UPGMA (Paired Group) y los índices de similitud Morisita (A y C) y Dice-Sorensen (B y D). Se indican los valores de bootstrap para 100 replicados excepto en C por exceso de datos con valor cero. Análisis conjunto de los resultados del T-RFLP *nirS* con ambas enzimas (*HhaI* y *MspI*) (A y B); y con la enzima *MspI* por separado (C y D)

MULTI DIMENSIONAL SCALING (MDS)

Se construyeron mapas del “non metric-MDS” a partir de las matrices basadas en los índices de similitud Sorensen-Dice, y Morisita junto con los valores de Stress de Shepard del T-RFLP *nirS* con ambas enzimas (*HhaI* y *MspI*) (Fig. 23).

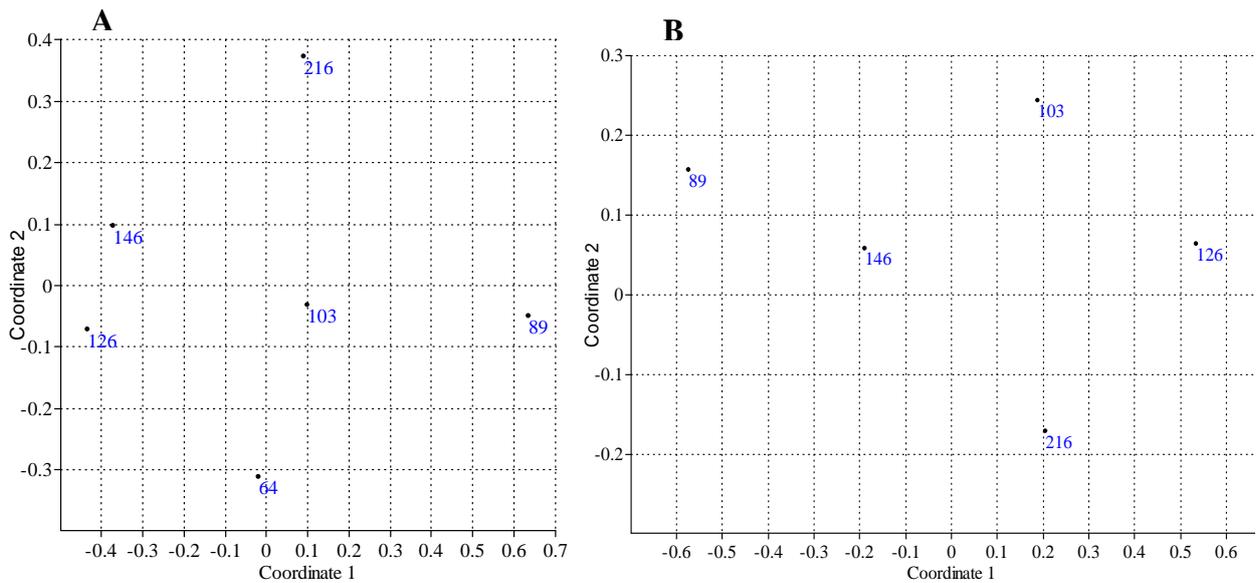


Figura 23. Mapas non metric MDS a partir de la matriz de similitud calculada con los índices de Dice-Sorensen con un valor de stress de Shepard = 0,184 (A) y Morisita con un valor de stress de Shepard = 0,1796 (B). Resultados del T-RFLP *nirS* con las enzimas *HhaI* y *MspI*.

El método MDS que resultó con mejor definición (Valor de Stress 0,14) fue el realizado en base a la matriz de distancia calculada a partir del índice de similitud de presencia ausencia Dice-Sörensen.

En base a la matriz calculada para las dos enzimas con el índice de similitud de Sorensen-Dice (Tabla XIV), se observó que todas las muestras presentaron mas de un 70% de similitud entre si. La muestra del día 89 fue la que presentó mayor distancia con las demás (30% de distancia aproximadamente). Las muestras del día 64 y 103 comparten aproximadamente el 90% de las especies al igual que lo que ocurre entre las

muestras 146 y 126. A su vez, estas últimas tienen un 80% aproximadamente de similitud con las muestras 216, 64 y 103. Si se tomase el criterio de que dos grupos son diferentes cuando presentan como mínimo un 20% de distancia, en este caso se detectarían 3 grupos (no se halló reporte de definiciones de similitud entre comunidades, por lo cual se tomó un criterio arbitrario en base a lo observado en la comunidad en estudio, y los resultados se informaron teniendo en cuenta dicho criterio). El grupo 1 estaría conformado solamente por la muestra 89, el grupo 2 por las muestras 126 y 146, y el grupo 3 por las muestras 64, 103 y 216 (Tabla XV, Fig. 22, Fig. 23).

Por otro lado, al analizar los resultados tomando en cuenta los cambios en la abundancia de especies (índice Morisita) se observó que sólo existe similitud mayor al 80% entre las muestras 64 y 216. Las demás muestras difieren entre sí más de un 30% (excepto las muestras 216 y 113 que difieren 28%). Por lo tanto, a pesar de existir cierta estabilidad en cuanto a la presencia/ausencia de especies, la abundancia relativa de las mismas cambió durante el monitoreo (Tabla XIV, Fig. 22, Fig. 23).

Tabla XIV. Matrices de similitud calculadas a partir de los índices Sorensen Dice (arriba) y Morisita (abajo). Resultados del T-RFLP *nirS* con las enzimas *HhaI* y *MspI* del lodo F.

	64	89	103	126	146	216
64	1	0.69565	0.91667	0.8	0.7619	0.7619
89	0.69565	1	0.78261	0.63158	0.7	0.7
103	0.91667	0.78261	1	0.8	0.85714	0.85714
126	0.8	0.63158	0.8	1	0.94118	0.70588
146	0.7619	0.7	0.85714	0.94118	1	0.77778
216	0.7619	0.7	0.85714	0.70588	0.77778	1
	64	89	103	126	146	216
64	1	0.55847	0.52543	0.49965	0.72883	0.82769
89	0.55847	1	0.52309	0.26686	0.66661	0.42802
103	0.52543	0.52309	1	0.64794	0.64197	0.72105
126	0.49965	0.26686	0.64794	1	0.62564	0.5929
146	0.72883	0.66661	0.64197	0.62564	1	0.53751
216	0.82769	0.42802	0.72105	0.5929	0.53751	1

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA)

De los 15 componentes (T-RFs de ambas enzimas) cada uno considerado como variable de este análisis) los primeros tres lograron explicar el 83,3 % de la varianza (Tabla XV). Por lo tanto se alcanzó un "nivel satisfactorio" de varianza explicada con pocos componentes (en este caso el software PAST brinda hasta tres componentes en la visualización del gráfico).

Otro criterio para seleccionar el número de componentes consistió en incluir solo aquellos cuyos valores propios fuesen mayores al promedio (0,996). Con este criterio, los primeros 5 componentes principales podrían tenerse en cuenta para el análisis (los cuales explican el 99,99 % de la varianza).

En este trabajo, para seleccionar los componentes a tener en cuenta, se consideró un número de componentes mínimos necesarios para explicar como mínimo el 80% de la varianza (Pla, 1986). Por lo tanto se seleccionaron los tres primeros componentes principales para el análisis (Tabla XV)

El PCA permitió agrupar las muestras y establecer hipótesis a cerca de cual o cuales podrían ser los componentes principales (de los cuales se obtuvo el % de varianza explicada, es decir la presión ejercida sobre la comunidad) que ocasionaron cambios en la estructura de la comunidad desnitrificante. El primer componente principal (component 1) el cual explicó un 34,7% de la varianza ocurrida, fue el componente por el cual se diferenció la muestra 89 de las demás. Este componente podría estar relacionado con la reinoculación (Etapa II), donde puede haber ingresado flora desnitrificante proveniente de la laguna anaerobia. Esta flora luego fue desplazada por la comunidad establecida anteriormente ya que se observó una readaptación de la comunidad desnitrificante (muestras 103 y 146 resultaron similares a la muestra 64 de la

Etapa I, según el componente 1). Sin embargo a las muestras 126, 146, 64, 103, y 216 se dividieron en dos grupos según el componente 2 el cual explicó el 27,4% de la varianza y según el componente 3 que explicó un 21,2%. Estos componentes difícilmente se encuentren relacionados con el cambio en la ley de control ya que la muestra 216 (Etapa IV) no se diferenció notoriamente de las muestras de etapas anteriores (Fig. 24).

Tabla XV. Valores propios de la matriz de correlación para cada componente y porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los 15 componentes principales. Resultados del T-RFLP *nirS* con las enzimas *HhaI* y *MspI* del lodo F. Valor Propio = Eigenvalue

Componente	Valor Propio	% Varianza
1	5.18	34.70
2	4.09	27.41
3	3.16	21.16
4	1.37	9.16
5	1.13	7.56
6	5.3E-16	3.5E-15
7	4.6E-16	3.1E-15
8	3.4E-16	2.3E-15
9	1.0E-16	6.9E-16
10	5.6E-17	3.8E-16
11	-3.1E-17	-2.1E-16
12	-2.7E-16	-1.8E-15
13	-3.3E-16	-2.2E-15
14	-4.7E-16	-3.1E-15
15	-1.1E-15	-7.3E-15
Promedio		SUMA
	0.996	100.00

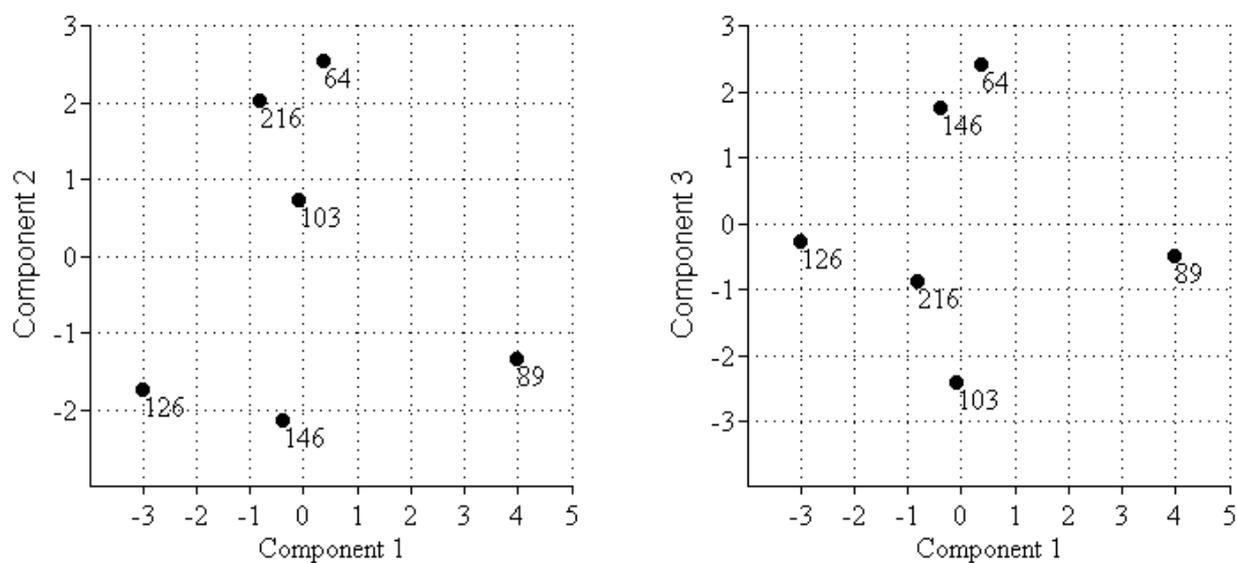


Figura 24. Gráficos que representan las distancias entre muestras según los componentes 1 y 2 (izquierda), 1 y 3 (derecha) a partir del análisis por T-RFLP del gen *nirS* *HhaI* y *MspI* basado en la matriz de correlación.

5.1.6. Análisis de la comunidad de AOB: T-RFLP y clonado del gen *amoA*

Se monitoreó la estructura de la comunidad de bacterias oxidantes de amonio mediante T-RFLP del gen *amoA* hasta el día de operación 216. En la reacción de amplificación por PCR del gen *amoA* a partir de las muestras de lodo se obtuvo una sola banda y del tamaño esperado (Fig. 25) indicando la presencia de este gen en las muestras. Primeramente se utilizaron las enzimas de restricción *TaqI* y *CfoI*, tanto para el T-RFLP como para el análisis de los clones ya que han sido las enzimas más utilizadas para este gen en trabajos previos (Horz et al., 2000). Las mismas poseen sitios de corte conocidos dentro del gen *amoA* para distintos géneros de AOB a partir de los cuales se calculó el tamaño del fragmento terminal esperado (tomando en cuenta el primer utilizado como origen del fragmento) (Tabla XVI).

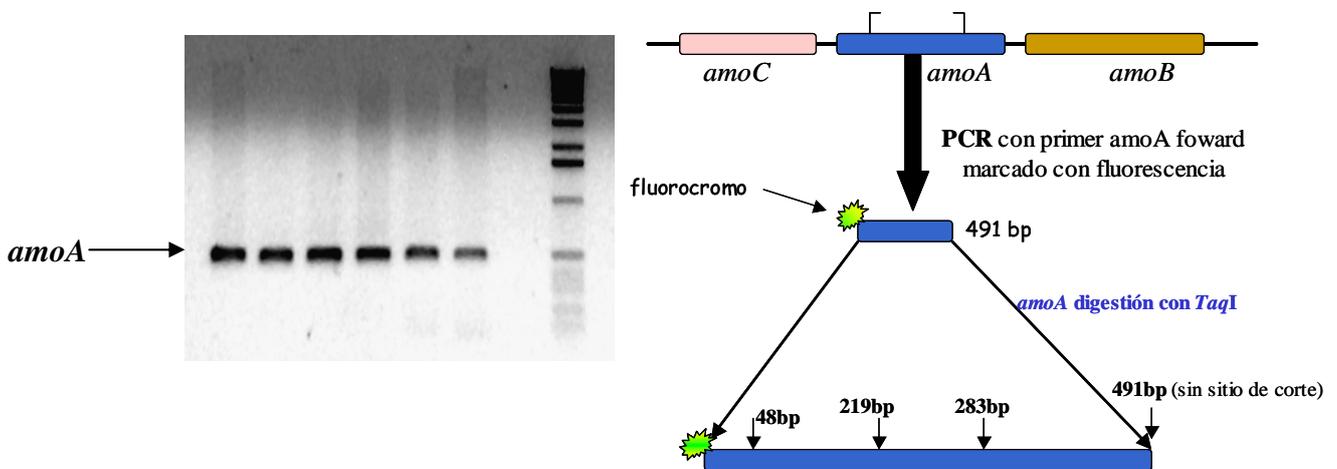


Figura 25. A. Fotografía de gel agarosa 0,8%. Amplificación por PCR del gen *amoA* de las muestras 35, 64, 89, 103, 126, 146, control negativo y marcador de peso molecular 1Kb leader. B. Esquema del gen *amoA* de codificante de la subunidad A de la enzima AMO y ejemplos de los sitios terminales de corte con *TaqI* para distintas especies de AOB.

Los T-RFs predominantes en el análisis con la enzima *TaqI* fueron los correspondientes a los tamaños 219pb y 283pb (Fig. 26). Estos picos se corresponden con el tamaño esperado a partir análisis in silico de secuencias de *amoA* (depositadas en el banco de portal NCBI) provenientes de organismos del cluster de *Nitrosomonas europaea* (219bp) y del cluster *Nitrospira/ Nitrovibrio* (283bp) (Tabla XVI). Sin embargo, a partir del día 146 el T-RF con *TaqI* correspondiente a secuencias de *amoA* posicionadas en el cluster de *Nitrosomonas europaea* no fue detectado. Esto podría sugerir que se habrían seleccionado organismos nitrificantes diferentes a pesar de que su número no presentó variaciones de acuerdo a la cuantificación por FISH. Además, las muestras de los días 166 y 216 presentaron un T-RF de tamaño 70pb con la enzima *TaqI* no detectado previamente, que no se corresponde con los tamaños de T-RFs (calculados en el análisis in silico) de ninguna de las AOB descritas hasta el momento (cuyas secuencias están depositadas en el portal NCBI). Esto podría estar relacionado con la

Tabla XVI. Resultados de la restricción *in silico* con *CfoI*, *AluI* y *TaqI* de secuencias de clones *amoA* (derecha) y de secuencias del banco de datos con el número de acceso (izquierda). Los valores están expresados en pares de bases (pb) y corresponden al tamaño esperado de fragmento terminal (T-RF). no cut = no presenta sitio de corte; ? = secuencia insuficiente para restricción in silico.

Secuencia depositada	Nº acceso	CfoI	AluI	TaqI	Nombre del clon	CfoI	AluI	TaqI
<i>Nitrospira sp.</i>	AJ298723	100	No cut	283	Famo1	68	No cut	219
<i>Nitrospira briensis</i>	U76553	66	No cut	283	Famo37	68	117	219
<i>Nitrospira sp.</i>	AY445617	68	No cut	283	Famo19	68	117	219
<i>Nitrosococcus mobilis</i>	AJ298701	119	379	219	Famo33	68	No cut	219
<i>Nitrosolobus multiformis</i>	U15733	66	No cut	283	Famo25	68	117	219
<i>Nitrovibrio tenuis</i>	U76552	68	34	283	Famo7	No cut	No cut	219
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	AF272404	119	No cut	48	Famo26	135	No cut	283
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	AJ238495	119	No cut	48	Famo3	135	223 224	283
<i>Nitrosomonas halophila</i>	AF272398	66	No cut	219	Famo15	135	No cut	283
<i>Nitrosomonas communis</i>	AF272399	66	184	No cut	Famo14	301	No cut	139
<i>Nitrosomonas marina</i>	AF272405	66	208	48	Famo2	301	?	283
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	AF272402	66	86	No cut				
<i>Nitrosomona europaea</i>	AB070981	68	No cut	219				
<i>Nitrosomonas aestuari</i>	AF272400	No cut	208	No cut				

selección de un nuevo taxón capaz de competir en las condiciones de operación del reactor luego del agregado de alitiourea.

El T-RF de 491pb (tamaño del gen *amoA* sin digerir) podría corresponder a: *Nitrosomonas communis*, *N. cryotolerans*, *Nitrosomonas sp* Nm143 (Purkhold et al., 2000) o a *Nitrosomonas aestuarii* (de acuerdo al análisis in sílico).

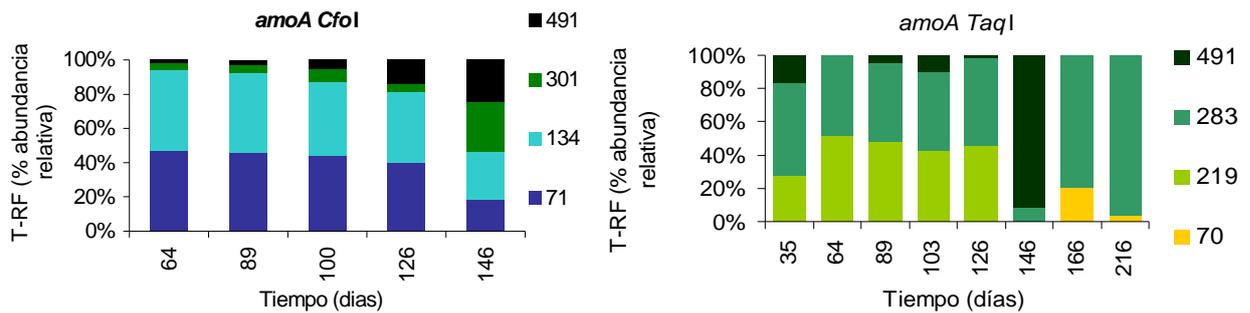


Figura 26. Análisis por T-RFLP del gen *amoA* de las muestras del lodo F. Resultados de la restricción con la enzima *CfoI* y con la enzima *TaqI*. Un fragmento = un color.

Por otra parte, según el perfil de T-RFLP con la enzima *CfoI*, no sucedieron cambios en la composición de taxones del gen *amoA* (Fig. 26), pero si hubo cambios en cuanto a la distribución de los mismos durante la operación principalmente en la muestra del día 146 la cual se diferenció de las demás con mas de un 20 % de distancia (Tabla XVII).

Tabla XVII. Matriz simétrica basada en el índice de similitud cuantitativo Morisita entre muestras de T-RFLP *amoA* con *CfoI*.

	64	89	103	126	146
64	1	0.99969	0.99441	0.97112	0.67233
89	0.99969	1	0.99665	0.97595	0.68804
103	0.99441	0.99665	1	0.98638	0.73438
126	0.97112	0.97595	0.98638	1	0.77908
146	0.67233	0.68804	0.73438	0.77908	1

El análisis con la enzima *AluI* mostró que la comunidad mantuvo los mismos taxones dominantes durante todo el monitoreo. Sin embargo los resultados obtenidos con dicha enzima no fueron los esperados en cuanto al numero de picos que se observaron en los cromatogramas, probablemente por digestión incompleta. Debido a ello y a que solo

podieron analizarse tres muestras con esta enzima, estos datos no fueron utilizados para comparar la diversidad y la similitud entre muestras (ANEXO 7).

Se analizó la diversidad de la comunidad AOB durante el monitoreo por T-RFLP del gen *amoA* con la enzima *CfoI* (los resultados obtenidos con la enzima *TaqI* mostraron la misma tendencia). Los resultados indicaron que la diversidad de bacterias oxidantes de amonio en el reactor F fue en aumento a pesar de que se mantuvo el número de taxones presentes (cuatro taxones), ya que aumentó la equitatividad en cuanto a la distribución de los mismos (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Índices de diversidad de AOB calculados a partir del T-RFLP del gen *amoA* con la enzima *CfoI*.

	Índices de diversidad AOB				
	día 64	día 89	día 103	día 126	día 146
Taxa_S	4	4	4	4	4
Individuals	14872	14845	14813	14934	14910
Dominance_D	0.44	0.43	0.39	0.35	0.26
Shannon_H	0.91	0.96	1.07	1.14	1.37
Simpson_1-D	0.56	0.57	0.61	0.65	0.74
Evenness_e^H/S	0.62	0.65	0.73	0.78	0.99
Hmax	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39
H/Hmax*100	65.82	69.08	77.33	82.52	98.97

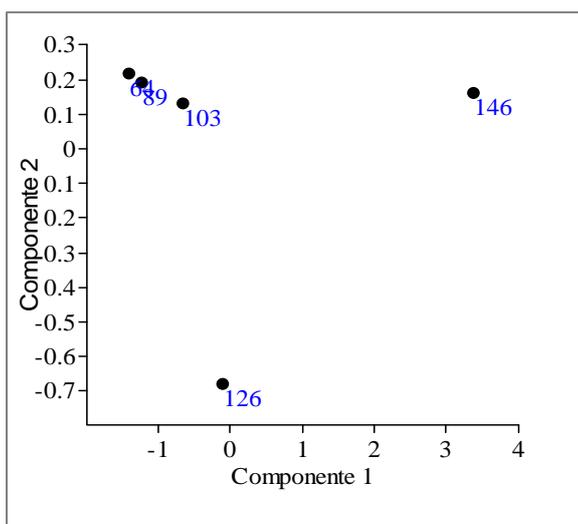


Figura 27. Representación gráfica de las distancias entre muestras según los dos componentes principales (análisis PCA) basada en la matriz de correlación. Resultado del T-RFLP *amoA* con la enzima *cfoI*.

Con los resultados del análisis del T-RFLP del gen *amoA* con la enzima *CfoI* se realizó el análisis de componentes principales. Se confirmó que la muestra mas distante es la del día 146 (Fig. 27) y el primer componente principal explicó un 96% de la varianza. Este cambio no pudo explicarse con las perturbaciones ocasionadas en la operación del

reactor F. Probablemente existieron variables desconocidas que causaron cambios en la comunidad AOB (cambio en la abundancia relativa según la enzima *CfoI* y la aparición de un T-RF no detectado previamente según análisis con la enzima *TaqI*).

Análisis de la comunidad AOB mediante clonado del gen *amoA* y correlación de las secuencias obtenidas con los datos de T-RFLP

Mediante el análisis del T-RFLP no se logró identificar los taxones a nivel de especie ya que muchas de ellas comparten el mismo sitio de corte para las enzimas utilizadas. Por lo tanto se realizó el clonado del gen *amoA* de la muestra del día 103 y se secuenciaron clones representativos de cada perfil resultante del RFLP (con *TaqI* y *CfoI*) de modo de analizar ambos resultados (análisis de clones y T-RFLP) conjuntamente.

Análisis de clones

Se realizó un screening de 34 clones mediante RFLP con las enzimas *TaqI* y *CfoI* donde se observó la presencia de cuatro perfiles de restricción diferentes. Se seleccionaron clones representativos de cada perfil para ser secuenciados y se realizó el análisis filogenético de las mismas. Para la construcción del árbol filogenético se seleccionaron las secuencias de mejor calidad abarcando todos los perfiles obtenidos. Por ejemplo la secuencia del clon Famo7 (perteneciente al perfil I) no fue utilizada para la construcción del árbol filogenético. En ese caso se secuenciaron otros clones del mismo perfil para los cuales se obtuvo mejor calidad de secuencia, como el clon Famo9.

El análisis indicó que las secuencias obtenidas se agruparon en el cluster 7 donde se ubican secuencias de *amoA* de *N. europaea* y *Nitrosococcus mobilis*, y en el cluster 3 donde se ubican secuencias de *amoA* de organismos del género *Nitrospira* (Fig. 28). Se utilizó el criterio sugerido por Purkhold donde se establece como umbral mínimo un 80 % de similitud entre genes *amoA* para considerarlos de la misma especie (Purkhold

et al., 2000) aunque existen otros criterios que establecen un umbral mayor a un 90 % (Sakano et al., 2002).

Tabla XIX. Resultados del análisis de secuencia de clones basado en la matriz de similitud del análisis filogenético de aminoácidos del gen *amoA* del lodo F. Homogeneidad se refiere a la similitud de secuencia entre los clones agrupados dentro del mismo perfil

Perfiles TaqI/CfoI	Abundancia relativa (%) de 34 clones	“Homogeneidad” (%)	Secuencia tipo*	Similitud (%)
A	82,4	92.7 - 99.5	<i>Nitrosomonas europaea</i>	94.3 - 100
B	11,8	96.4 – 99.0	<i>Nitrospira tenuis</i>	83.5 - 95.4
C	2,9	-----	<i>Nitrospira tenuis</i>	88.2
			<i>Nitrospira cryotolerans</i>	88.4
D	2,9	-----	<i>Nitrospira tenuis</i>	94.2

En la muestra del día 103 (muestra donde se realizó el clonado) se observó dominancia de genes de *amoA* relacionados con genes provenientes de la especie *Nitrosomonas europaea* y en segundo orden las secuencias se relacionaron con secuencias de *amoA* de organismos de la especie *Nitrospira tenuis* (Tabla XIX).

La correlación entre los datos del T-RFLP (con *CfoI*) y el análisis in silico de las secuencias de *amoA* mostró que la muestra **146** presentó mayor proporción de los **T-RFs de 134, 301 y 494** los cuales se correlacionaron (con una tolerancia de 5 pb) con las secuencias de los clones F26-F3-F15 (T-RF 134) y F14-F2 (T-RF 301). Estas secuencias se relacionaron filogenéticamente con secuencias de *amoA* de organismos de la especie *Nitrospira tenuis* y con la secuencia del clon F7 (T-RF 494, sin sitio de corte para *CfoI*) relacionado con la especie *Nitrosomonas europaea*. Sin embargo las demás muestras presentaron mayor abundancia de los **T-RFs 71 y 134**, donde el T-RF de tamaño 71 se correlacionó con el tamaño esperado a partir del análisis in silico de la secuencia de los clones F1-F37-F19-F33-F25, estas secuencias se relacionaron filogenéticamente con secuencias de *amoA* de la especie *Nitrosomonas europaea*.

5.1.7. Análisis de bacterias totales: T-RFLP y clonado del gen ARNr 16S

La dinámica de la comunidad de bacterias totales se analizó mediante el T-RFLP del gen ARNr 16S con las enzimas *MspI* y *HhaI*.

Se detectó un alto número de T-RFs con ambas enzimas donde algunos de ellos estuvieron presentes en más de una muestra. Sin embargo ningún T-RF se detectó en todas las muestras (Fig. 29).

El análisis con ambas enzimas mostró una comunidad muy compleja y variable en el tiempo donde todas las muestras presentaron índices de similitud bajos entre sí (<80% según el cálculo de los índices de similitud Dice-Sorensen y Morisita, representados en el análisis de Cluster, Fig. 30) indicando que en cada punto ocurrió un recambio de especies en el reactor. La muestra del día 146 fue la que presentó mayores diferencias con respecto a las demás muestras, indicando un cambio en la estructura de la comunidad de bacterias tanto a nivel taxonómico como cuantitativo en este punto (Fig. 30).

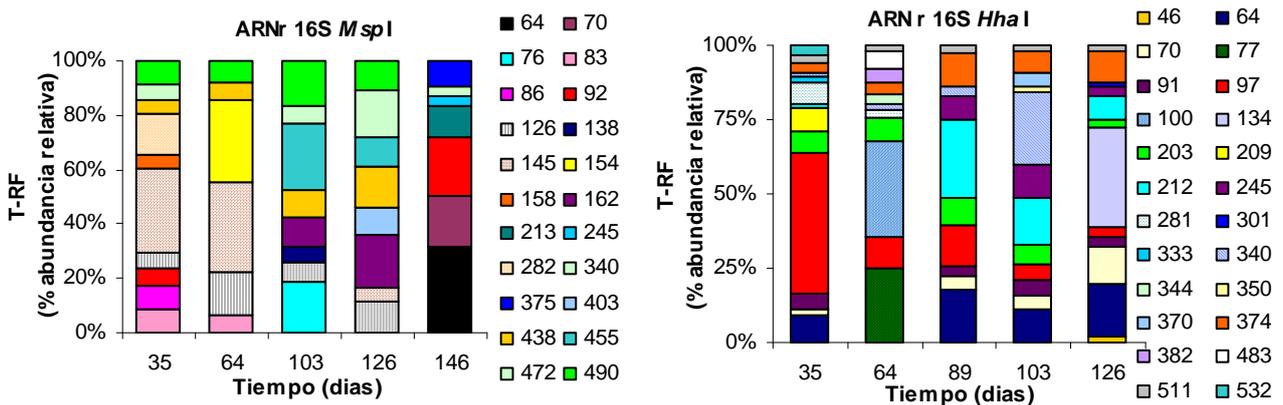


Figura 29. Análisis por T-RFLP del gen ARNr 16S de las muestras del lodo F. Resultados de la restricción con las enzimas *MspI* y *HhaI*. Un color = un T-RF

Las muestras presentaron altos valores de diversidad, aunque la muestra del día 64 fue la menos diversa comparada con las demás (Tabla XX). Se analizó la correlación entre la diversidad obtenida con ambas enzimas y las actividades oxidantes de amonio, de nitrito y de acetato. Los resultados indicaron que no hubo correlación significativa (la probabilidad de no estar correlacionadas fue $>0,05$).

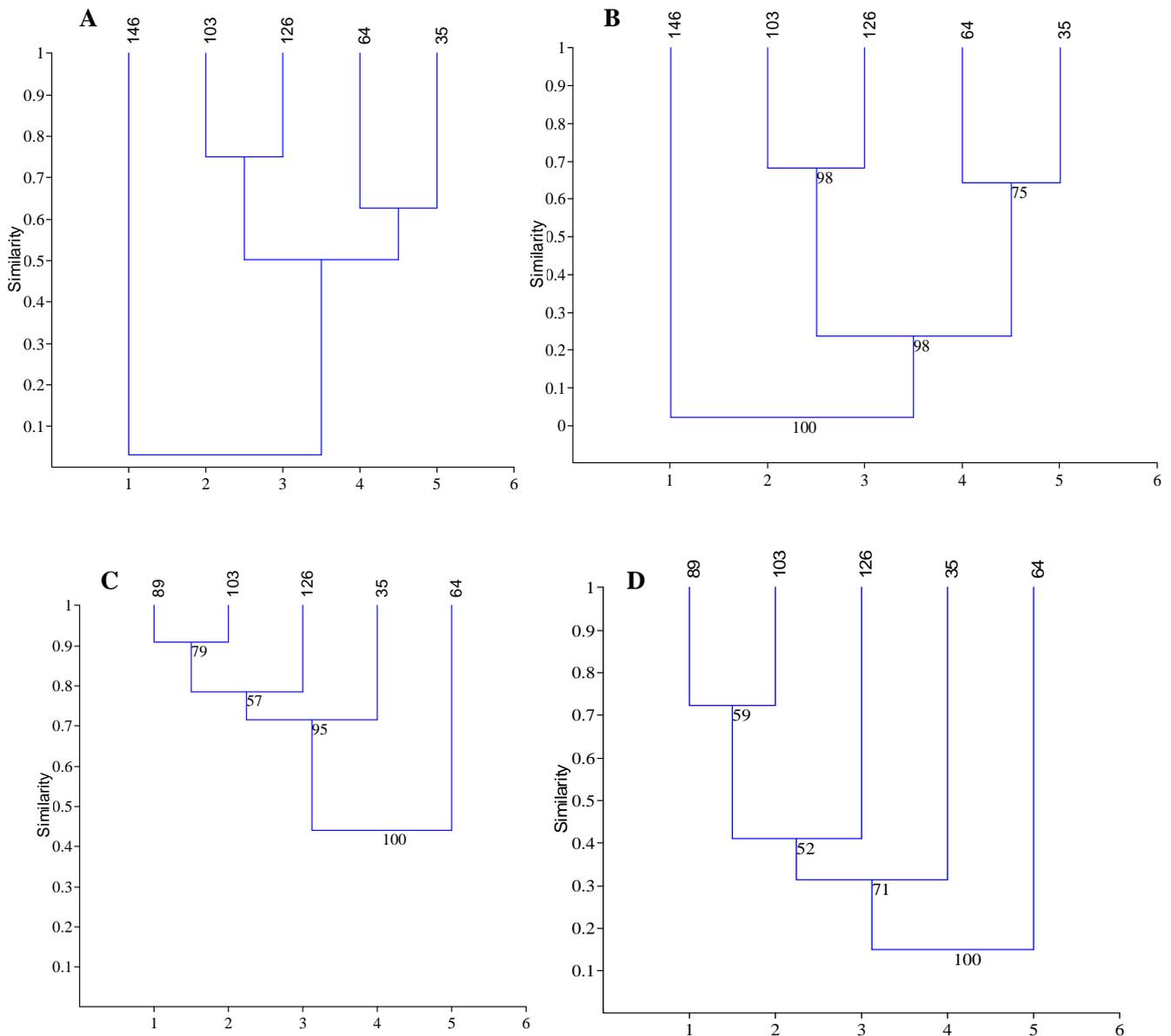


Figura 30. Análisis de cluster de las muestras a partir del T-RFLP del gen ARNr 16S con las enzimas *MspI* (A y B) y *HhaI* (C y D) utilizando el algoritmo UPGMA (Paired group) y el índice de similitud cuantitativo Morisita (B y D) y el índice de similitud presencia/ausencia Dice-Sorensen (A y C). Se indican los valores de bootstrap para 100 replicados excepto en A donde ocurrió un defecto en el programa PAST por exceso de datos con valor 0.

En este caso no se realizó la asignación de identidad a los T-RF obtenidos ya que se trata de una población compleja (dominio *Bacteria*) donde cada T-RF podría corresponder a un alto número de especies presentes. Por lo tanto se analizó la estructura de la comunidad en el tiempo sin identificar las especies presentes.

De todos modos se realizó el clonado del gen ARNr 16S de una muestra para conocer cuales fueron los grupos bacterianos dominantes en ese punto tal como se describe a continuación.

Tabla XX. Índices de diversidad de bacterias en el lodo F calculados a partir del T-RFLP del gen ARNr 16S con las enzimas *MspI*, *HhaI*, y el análisis conjunto de ambas enzimas durante los días de operación 35, 64, 89, 103, 126 y 146. nd = no hay datos debido a problemas con la electroforesis del T-RFLP.

Índices de diversidad (<i>Msp I</i>)						
	día 35	día 64	día 89	día 103	día 126	día 146
Taxa_S	10	6	nd	8	8	7
Individuals	989	901	nd	916	1125	1508
Dominance_D	0.16	0.24	nd	0.16	0.14	0.21
Shannon_H	2.09	1.58	nd	1.96	2.02	1.71
Simpson_1-D	0.84	0.76	nd	0.84	0.86	0.79
Evenness_e^H/S	0.81	0.81	nd	0.89	0.94	0.79
Hmax	2.30	2.30	nd	2.30	nd	2.30
H/Hmax*100	91	69	nd	85	nd	74
Índices de diversidad (<i>Hha I</i>)						
	día 35	día 64	día 89	día 103	día 126	día 146
Taxa_S	13	11	10	12	12	nd
Individuals	3642	3341	3655	3414	3701	nd
Dominance_D	0.26	0.19	0.15	0.13	0.18	nd
Shannon_H	1.91	1.95	2.05	2.25	2.01	nd
Simpson_1-D	0.74	0.81	0.85	0.87	0.82	nd
Evenness_e^H/S	0.52	0.64	0.78	0.79	0.62	nd
Hmax	2.56	2.56	2.56	2.56	2.56	nd
H/Hmax*100	74	76	80	88	78	nd
Índices de diversidad (<i>Hha I</i> y <i>Msp I</i>)						
	día 35	día 64	día 89	día 103	día 126	día 146
Taxa_S	27	21	nd	24	24	nd
Individuals	4966	4539	nd	4938	5314	nd
Dominance_D	0.15	0.12	nd	0.07	0.10	nd
Shannon_H	2.64	2.57	nd	2.91	2.75	nd
Simpson_1-D	0.85	0.88	nd	0.93	0.90	nd
Evenness_e^H/S	0.52	0.62	nd	0.77	0.65	nd
Hmax	3.30	3.30	nd	3.30	3.30	nd
H/Hmax*100	80.0	77.9	nd	88.4	83.6	nd

Análisis de clones del gen ARNr 16S

Se secuenciaron 75 clones del gen ARNr 16S de la muestra del día 103 del reactor F. Se realizó el análisis filogenético de las secuencias de manera de identificar los grupos microbianos presentes en la muestra. Los resultados obtenidos mediante la comparación con secuencias del banco de datos Gen Bank realizada con la herramienta Blast indicaron una notoria dominancia de los phylum *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. Luego en menor proporción se encontraron clones relacionados con *Actinomycetales*, *Planctomycetes*, *Chlorobium*, *Spirochaetales*, *Sphingobacteriales*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, y *Nitrospira*. Además muchas secuencias resultaron estar relacionadas con secuencias de especies aún no descritas (AF314423) que, de acuerdo a la muestra de la que provienen, podrían estar involucradas en la remoción de fósforo (Dabert et al., 2001). Dentro del phylum *Proteobacteria* las clases dominantes fueron *gamma* con un 21,3 %, *beta* un 17,3 %, y *alfa* un 14,7 % (Fig. 31).

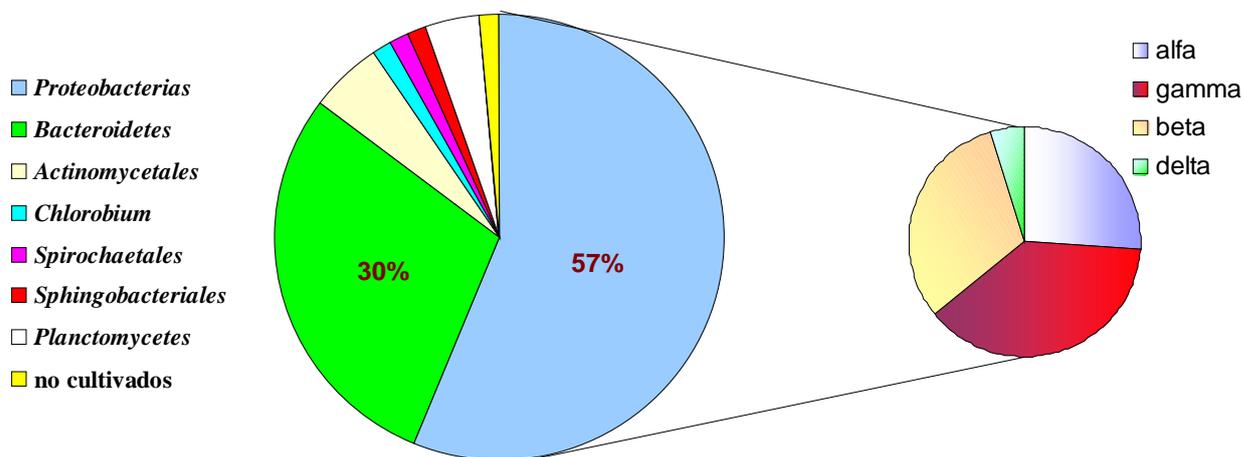


Figura 31. Frecuencia relativa de clones donde se representan los grupos microbianos presentes en la muestra del día 103 del lodo F según el análisis de secuencias de clones del gen ARNr 16S. Se indica la distribución de las clases de alfa, beta, gamma y delta *Proteobacterias*

La mayor parte de las secuencias presentaron bajo porcentaje de similitud con especies conocidas por lo cual solo se logró relacionar a nivel de clases y grupos de bacterias. Este resultado no fue sorprendente ya que en la bibliografía se encontró que un alto porcentaje de bacterias presentes en un reactor SBR aerobio/anóxico no pertenecían a especies conocidas según el análisis de secuencia de clones ARNr 16S (Dabert et al., 2001). Esto sugirió que probablemente la mayor parte de las bacterias presentes se traten de especies no descritas aún, y que tal vez las bacterias aisladas a partir del lodo no representen realmente las especies heterótrofas dominantes.

Consideraciones finales y conclusión general capítulo 1

En este capítulo se presentó el análisis de la comunidad microbiana del reactor F durante 643 días de operación, utilizando métodos de medida directa de actividad por respirometría, métodos de biología molecular (T-RFLP y clonado) y métodos de cultivo.

La caída abrupta de las tres actividades potenciales el día 60 coincidió con la entrada anormal de sólidos totales y volátiles provenientes de la laguna anaerobia, lo cual debería prevenirse ya que podrían ingresar tóxicos que afectan a todos los microorganismos de forma irreversible. A partir del día 35 se detectaron organismos del dominio *Archaea*, coincidiendo con un aumento de sólidos en el influente. Probablemente se trate de microorganismos metanogénicos presentes en la laguna anaerobia, o podría tratarse de AOB del dominio *Archaea* las cuales podrían tener un rol importante en el ciclo del nitrógeno tal como se ha reportado recientemente (Park et. al., 2006; Nicol y Schleper, 2006).

En cuanto a la evaluación de las medidas tomadas en la operación del reactor se llegó a la conclusión que la reinoculación fue útil para lograr recuperar la actividad del reactor. Si bien a escala real es una medida muy costosa, esta sería la medida más rápida en caso que el reactor perdiera la capacidad de remoción de nutrientes. La comunidad microbiana presente tardó cierto tiempo en estabilizarse (estabilizarse funcionalmente, ya que la estructura no se estabilizó en ningún momento según el análisis por T-RFLP) luego de la reinoculación pero la eficiencia de remoción de nutrientes se recuperó rápidamente una vez reinoculado el reactor.

Se ha reportado que la nitrificación es la etapa limitante en el proceso de remoción de nitrógeno debido a la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos que la llevan a cabo y a la sensibilidad frente a cambios en el medio (pH, temperatura etc.) (Okabe et al., 1999). Incluso había sido reportado que el primer paso de la nitrificación (oxidación de amonio a nitrito) es el limitante en el proceso de nitrificación debido a la mayor sensibilidad a tóxicos de las AOB (Barnes y Bliss, 1983). Sin embargo se demostró que la entrada de algunos inhibidores (alitiourea y 4-clorofenol) al reactor no alteran significativamente la estructura de la comunidad microbiana ni la eficiencia de remoción de nutrientes del reactor, y la actividad potencial se recuperó una vez eliminados los inhibidores del lodo (tanto para las actividades heterótrofa y oxidante de nitrito como para la actividad oxidante de amonio).

La disminución en el tiempo de aireación (ciclo tipo II) fue planteada debido a que la desnitrificación en el reactor no era completa quedando materia orgánica (DQO) y nitrato remanente al final del ciclo. La DQO remanente podría ser no biodegradable por las bacterias heterótrofas presentes tal como se ha reportado en trabajos previos (Bortone, 1992). Debido a que luego de 4 horas de aireación no se observaban cambios en los parámetros del efluente se concluyó que dicha etapa era excesiva y debía tomarse una medida aplicable a nivel industrial. Por estos motivos fue que se modificó el ciclo de operación reduciendo la etapa aerobia de manera de mejorar la eficiencia de remoción de nutrientes favoreciendo la desnitrificación. Luego de tomar esta medida se logró una eficiencia de remoción de nitrógeno y DQO alta y estable en el reactor F.

La actividad oxidante de amonio potencial resultó mayor que la obtenida dentro del reactor, sin embargo la eficiencia de remoción de amonio fue alta (media = 97 %) durante todo el monitoreo. Si se aplicara mayor carga de amonio durante el ciclo tipo II, probablemente el reactor removería el nitrógeno con alta eficiencia, pero en un tiempo

mayor que el calculado (Sección 5.1.1). En caso de demostrarse que el factor limitante en la velocidad de oxidación de amonio fuese el oxígeno, y se necesitase remover el amonio con mayor velocidad debería optimizarse la transferencia de O₂ en el reactor por ejemplo aplicando mayor agitación durante la aireación.

Por otro lado, el hecho de que la remoción de amonio en el reactor se haya efectuado con un 100% de eficiencia no significa que la disminución del tiempo de aireación no haya afectado el crecimiento de las AOB y NOB; de hecho la actividad potencial de las NOB tuvo una disminución importante luego del cambio de ley de control al disminuir el tiempo de aireación por ciclo.

En cuanto a la comunidad oxidante de amonio, según los resultados del T-RFLP *amoA* se observó una flora oxidante de amonio relativamente estable en el tiempo en cuanto a la composición microbiana y con poca riqueza de especies (según el análisis con *TaqI* y *CfoI*) pero con índices de diversidad que fueron aumentando en el tiempo. Los cambios en la abundancia relativa diferenciaron a la muestra del día 146 de las demás, y luego en la muestra del día 166 apareció un nuevo taxón (detectado en el análisis con la enzima *TaqI*). Este cambio en la estructura coincidió con el cambio observado en la comunidad de organismos del dominio Bacteria detectados con el T-RFLP del gen ARNr 16S. Esto podría indicar que la presencia de algunas especies de bacterias favoreció la instalación de otras especies de AOB o viceversa, tal vez por razones de mutualismo, competencia, etc.

En el análisis de T-RFLP del gen *amoA* los picos obtenidos con las enzimas *CfoI* y *TaqI* pudieron ser asignados en su totalidad excepto para el T-RF con *TaqI* con un tamaño de 70 pb. Este T-RF podría corresponder a un gen *amoA* de una bacteria aún no descrita.

La estructura de la comunidad oxidante de amonio estuvo dominada principalmente por bacterias relacionadas con *Nitrosomonas europaea* y *Nitrospira tenuis* durante todo el monitoreo excepto en el día 146 donde no se detectó *Nitrosomonas europaea*. Esta especie habitualmente se encuentra en plantas de disposición final de residuos, aguas eutrofizadas y aguas negras junto con *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosomonas halophila* y *Nitrosococcus mobilis*. Sin embargo *Nitrospira tenuis* habitualmente se encuentra en suelos, rocas y en algunos tipos de aguas residuales (Koops y Pommering-Roser, 2001). Por otro lado en sistemas de lodos activados se ha encontrado principalmente *Nitrosococcus mobilis* (Koops y Pommering-Roser, 2001; Juretschko et al., 1998) el cual no fue detectado en el reactor F según el análisis de clones.

En cuanto a la estructura de la comunidad desnitrificante permaneció relativamente estable en cuanto a la composición de especies que contienen el gen *nirS*, variando la proporción de las mismas a lo largo del monitoreo. Sin embargo, la perturbación ocasionada con la primer reinoculación causó cambios en la estructura de la misma (día 89) pero que luego con el transcurso del tiempo la comunidad establecida volvió a estabilizarse previo a la reinoculación.

Entre las bacterias desnitrificantes que predominaron en el monitoreo del reactor F se encontraron los géneros *Thauera*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Paracoccus*, y *Dechloromonas*. Además, mediante FISH con una sonda específica para el género *Thauera* se demostró la presencia de este microorganismo (Fig. 32), y mediante aislamiento en placa de TSA se encontró el género *Pseudomonas*. Estos géneros también han sido encontrados en otros tipos de sistemas de tratamiento de efluentes con distinto tipo de alimentación. Esto podría deberse a una presión selectiva que favorece estos grupos, como por ejemplo la capacidad de formar cúmulos y mantenerse en el

reactor (Travers et al., 2005c). En estudios previos se encontró especies desnitrificantes del género *Paracoccus* y *Thauera* en sistemas SBR aunque en distintas proporciones que en este caso (Calli et al. 2003). Además el género *Thauera* junto con *Acidovorax* y *Alcaligenes* han sido reportados en ecosistemas ricos en compuestos recalcitrantes (Etchebehere et al., 2001) al igual que los microorganismos desnitrificantes aislados pertenecientes al género *Ochrobactrum* (Muller et al., 1998).

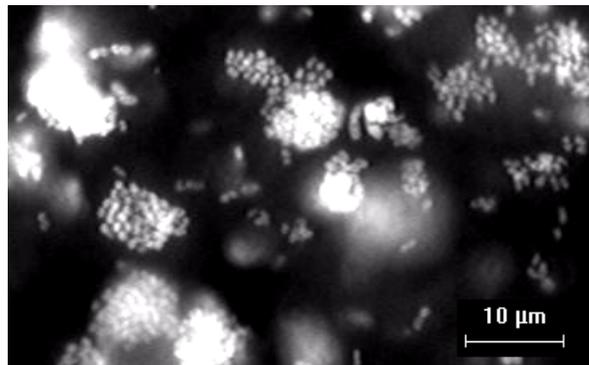


Figura 32. Fotomicrografía de fluorescencia del lodo F con la sonda específica para el género *Thauera*.

En cuanto a la comunidad de bacterias presentes en el reactor F se destacó la alta riqueza taxonómica (numero de T-RFs) encontrada y su variabilidad en el tiempo sugiriendo un posible proceso de sucesión de especies. Este fenómeno podría deberse a la presión selectiva del tipo de operación del sistema (teniendo en cuenta además el aporte de especies que podrían ingresar desde el efluente de laguna anaerobia). En este caso se podría decir que las especies mejor adaptadas fueron las dominantes por ejemplo aquellas con capacidad de formar flóculos para sedimentar y no ser eliminadas del reactor con el efluente. O bien podría tratarse de una sucesión (desarrollo de la comunidad por cambio direccional en el tiempo) donde las especies pioneras se establecieron en primer lugar modificando algunas características del ecosistema, donde luego otras especies mejor competitivas comenzaron a dominar. Otros tipos de interacciones además de la competencia podrían tener un rol importante en la sucesión

de especies como la cooperación, el mutualismo, la predación, etc., no solo entre las bacterias presentes sino también con otros organismos como por ejemplo protozoarios. El entendimiento de las sucesiones ecológicas en un reactor permite optimizar la performance y la estabilidad ya que a menudo las plantas de tratamiento sufren fallas impredecibles que de esta manera podrían preverse.

En la muestra del día 146 (Etapa II) se observó un cambio en la estructura de la comunidad de bacterias (y de AOB) lo que coincidió con el descenso de las tres actividades respirométricas y con la disminución de la proporción de bacterias activas con respecto al total de bacterias presentes (Fig. 33). Lo que podría sugerir que se seleccionaron especies con menor actividad específica previo al agregado de tóxicos que desplazaron otras especies presentes probablemente por mecanismos de competencia. Otra explicación podría ser que hubo algún factor que causó la muerte de parte importante de la biomasa o que se produjo la entrada de células muertas durante la reinoculación y por ello el aumento de sólidos de los cuales solo una fracción correspondería a biomasa activa.

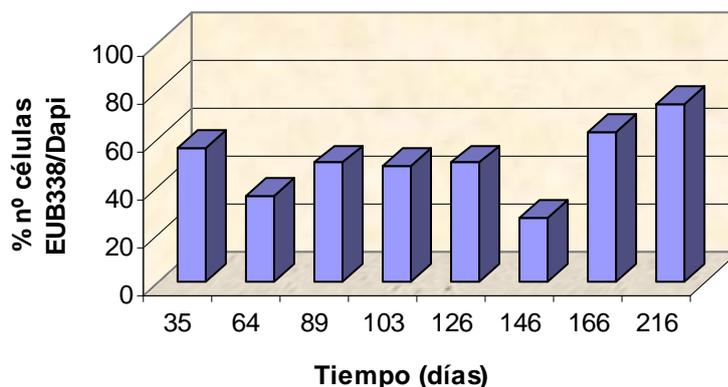


Figura 33. Proporción de bacterias activas en el total de bacterias durante 216 días de monitoreo.

En cuanto a los grupos microbianos presentes, el reactor F presentó una comunidad diferente a las que han sido reportadas para otros sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales encontrándose una alta proporción de organismos afiliados a los grupos *Bacteroidetes* y *gamma Proteobacteria* comparado con datos reportados de otros sistemas. Por ejemplo en un sistema de lodos activados aireado intermitentemente (nitrificante/desnitrificante) se encontró mediante análisis de clones un 59% de Proteobacterias (principalmente de las clases *Beta*, *Alfa*, y *Delta*), un 16 % de GNS (green nonsulfur bacteria), 12 % *Planctomycetes* y un 1 a un 5 % de *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Nitrospira*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Juretschko et al., 2002).

Se comparó la composición de bacterias del reactor F con la de un sistema SBR escala real para el tratamiento terciario de efluentes de una curtiembre en Uruguay (Lodo BRC1; los datos fueron extraídos a partir del trabajo realizado por Draper, 2006 en el Laboratorio de Microbiología, Facultad de Química UDELAR). La comunidad microbiana de ambos lodos resultó diferente (Fig. 34), es decir que el tipo de influente, el tipo de operación (1 ciclo por día y aireación de 12 horas) y el hecho que sea un sistema a escala real de algún modo pudieron tener un rol importante en la selección de la flora predominante.

Es importante destacar que por medio de este trabajo se reportó por primera vez que miembros del phylum *Bacteroidetes* fueron numéricamente importantes en un sistema tipo SBR nitrificante/desnitrificante. Sería interesante determinar con sondas de FISH específicas para este grupo si el porcentaje encontrado se trata de microorganismos activos. Sin embargo este phylum había sido reportado aproximadamente con 40 % de abundancia en un sistema de lodos activados para el tratamiento de aguas domésticas de

recirculación (Hoshino et al., 2006) y con un 20 % en un reactor de laboratorio (Hoshino et al., 2005).

Por otra parte se observó que las especies encontradas según el análisis del gen ARNr 16S no se corresponden con las especies encontradas según el análisis de los genes *amoA* y *nirS*, ni con las especies aisladas en TSA. Esto indicó que la proporción de bacterias desnitrificantes con gen *nirS*, y de bacterias oxidantes de amonio es menor que las detectadas con análisis dirigido a Bacterias totales. Sin embargo se debe tener en cuenta que se trata de análisis a partir de técnicas que tienen cierto sesgo como la amplificación por PCR donde podría existir una amplificación diferencial de los genes en estudio, es decir que algunos ADN amplifican preferencialmente sobre otros. Esto puede ocurrir debido a que no todas las bacterias poseen el mismo número de copias del gen del ARNr, por lo tanto se sobrestimaría la proporción de aquel organismo con alto número de copias y a la inversa con los que tengan sólo una copia del gen en estudio. La frecuencia observada de clones también se puede ver modificada por la eficacia de lisis celular llevada a cabo en la obtención del material genético, y de la eficacia de extracción y purificación del ADN (Amann et al., 1995). Por lo tanto, la frecuencia obtenida mediante el análisis de clones, no se considera una medida exacta de la verdadera proporción de bacterias en la muestra original. Sin embargo, conocer la procedencia y la abundancia de ciertos clones, puede ser de gran utilidad para identificar la flora existente en la muestra y obtener a grandes rasgos las proporciones de dicha flora así como también es útil para asignar identidad a los T-RFs del T-RFLP.

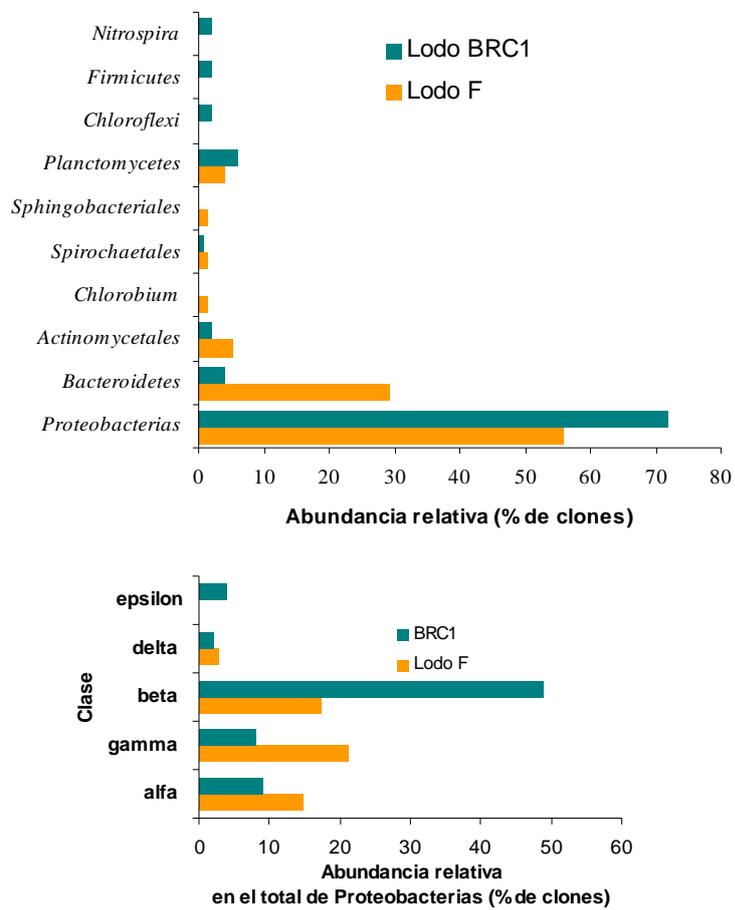
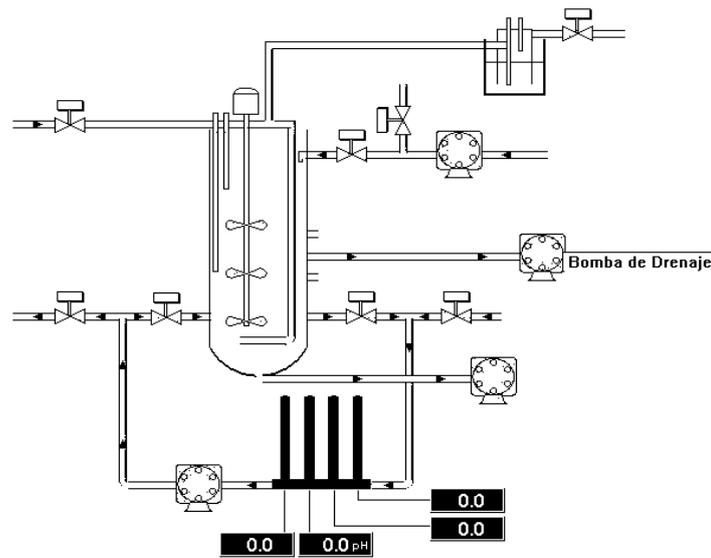


Figura 34. Comparación de la composición microbiana entre los lodos F y BRC1(Draper et al., 2006)

Resultados y Discusión

5.2 CAPITULO 2

Reactor M



5.2.1 Análisis de actividad respirométrica y FISH

En este caso, al igual que para el reactor F, se verificó que la concentración de uso de los sustratos amonio y acetato fuesen saturantes para el lodo M de manera de asegurar que las medidas correspondían realmente de actividad **potencial** ya que se midió en condiciones óptimas de temperatura, pH, aireación y de concentraciones de sustrato. Para ello se construyeron curvas de saturación con concentraciones crecientes de sustrato y se midió la actividad respirométrica en cada caso. Se observó que tanto la velocidad oxidante de amonio como la oxidante de acetato siguen una cinética tipo Michaelis-Menten. En este caso la concentración de saturación para el amonio fue de aproximadamente 2 ppm N-NH_4^+ lo cual difiere de lo encontrado en bibliografía donde se plantea un valor de saturación de 15ppm para el amonio (Gorska et al., 1996). La cinética de oxidación del acetato siguió una cinética del mismo tipo, donde se verificó que la concentración de DQO agregada (200ppm DQO-acetato) era saturante (Fig. 35).

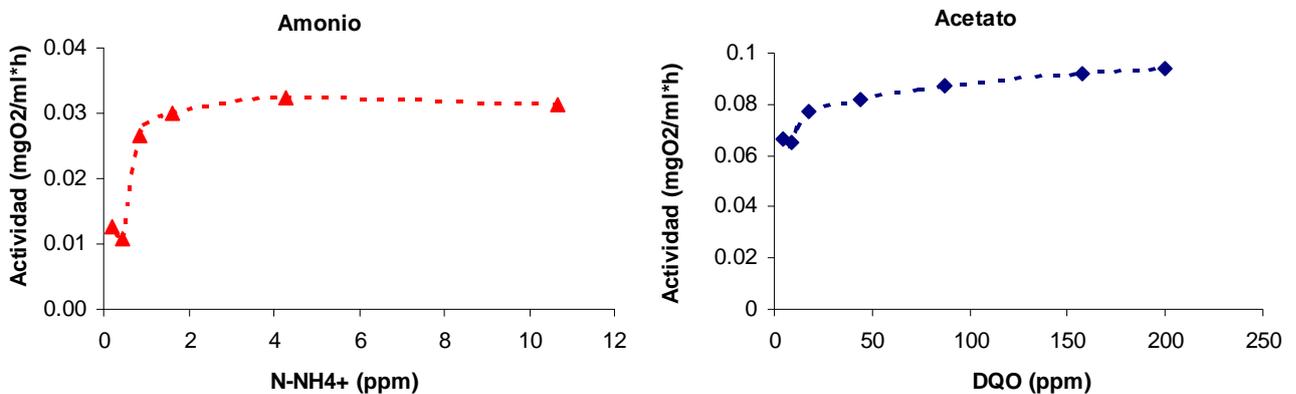


Figura 35. Curvas de saturación de amonio y acetato para el lodo M. Para el ensayo de actividad potencial se utilizaron 60 ppm de N-NH_4^+ y 200 ppm de DQO-acetato

En este caso tampoco se realizaron curvas de saturación de nitrito por lo que se utilizó la concentración (10 ppm N-NO_2^-) sugerida por los métodos de análisis del proyecto EOLI y por la bibliografía (Cabezas, 2005).

Para analizar los cambios en la actividad ocurridos en el reactor M, se distinguieron 5 períodos según el tipo de operación y las perturbaciones ocasionadas (Fig. 36):

Período 1. Inicio de operación (start up). El reactor presentó valores promedio altos de actividad heterótrofa pero con muy alta variabilidad (Tabla XXI). Esto podría deberse a que las condiciones de operación aún eran variables, por lo que la comunidad microbiana probablemente no era estable. Por otra parte se observó que el lodo presentaba poca sedimentabilidad ocasionando pérdidas de lodo en el efluente.

Período 2. Se realizó el tratamiento del reactor con polímero floculante de manera de mejorar la sedimentación del lodo (para minimizar los sólidos en el efluente) y para lograr estabilizar la comunidad presente evitando su lavado durante el vaciado del reactor. Si bien la actividad heterótrofa promedio disminuyó (casi un 50%), la misma se logró estabilizar (Fig. 36). Probablemente el agregado de floculante seleccionó una población heterótrofa mas estable, lo que hace mas predecible el funcionamiento del reactor. En cuanto a la performance del reactor se obtuvieron resultados positivos, entre ellos el aumento de velocidad de sedimentación del lodo (40%) disminuyendo los sólidos en el efluente.

Período 3. Aumento de la carga orgánica. La actividad heterótrofa mostró un leve aumento (Tabla XXI), sin embargo el mismo no fue estadísticamente significativo.

Período 4. Reinoculación y cambio de ley de control. Entre el período 3 y 4 el lodo volvió a perder sedimentabilidad por lo que fue necesaria la reinoculación del reactor. De esa forma se recuperó biomasa de lodo y se pretendía mejorar la sedimentabilidad del mismo. El lodo presentó un pico con alta actividad el día de reinoculación. Simultáneamente con la reinoculación, se cambió la ley de control del reactor. La

actividad heterótrofa aumentó durante este período (Tabla XXI). Podría suponerse que la comunidad establecida tiene microorganismos con mayores tasas de degradación.

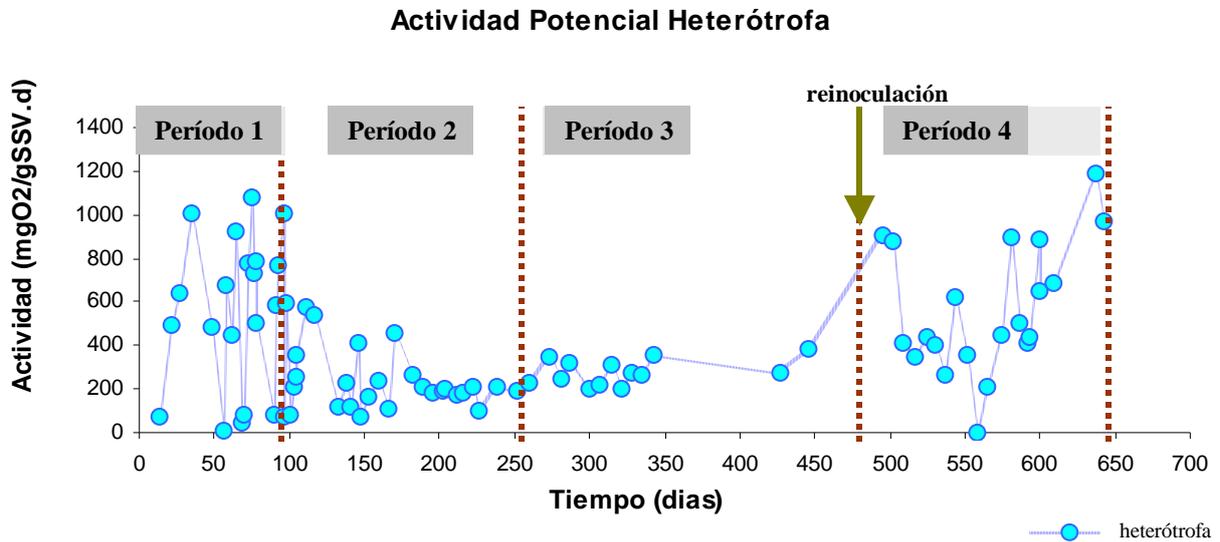


Figura 36. Actividad potencial heterótrofa vs. tiempo de operación del reactor M.

Tabla XXI. Valores descriptivos de los estadísticos básicos de la actividad potencial heterótrofa del lodo M. Los valores de media, mínimo, máximo y desviación estándar se expresan en mgO₂/gSSV.día

	Actividad heterótrofa			
	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3	Periodo 4
N	22	25	14	21
Media	541	237	274	567
Desviación estándar	346	135	62	295
Mínimo	13	77	196	0
Máximo	1080	581	387	1185

Debido al bajo contenido de amonio del influente, el reactor M presentó baja actividad nitrificante o por debajo del límite de detección (no se presentan los datos) al igual que el número de bacterias nitrificantes analizadas mediante FISH durante todo el monitoreo (Tabla XXII).

Tabla XXII. Resultados de FISH del reactor M. Los grupos microbianos analizados fueron: Bacteria (EUB338), oxidantes de amonio (Nso1225), oxidantes de nitrito (Nit3 Nitrobacter spp. y Ntspa662 Nitrospira spp.), Archaea (Arch915)

	Día de operación del reactor M				
	64	132	153	216	252
DAPI	2,9E+09	1,7E+09	9,6E+08	6,0E+08	7,8E+08
EUB	1,8E+09	7,4E+08	5,1E+08	3,1E+08	2,5E+08
NSO	<lim	<lim	<lim	<lim	<lim
Nit	<lim	<lim	<lim	<lim	<lim
Ntspa	<lim	<lim	<lim	<lim	<lim
Arch	6,4E+06	2,0E+07	<lim	<lim	<lim

La eficiencia de remoción de DQO en el reactor M (según datos obtenidos en la Facultad de Ingeniería) se vio reflejada en la actividad heterótrofa medida en el ensayo respirométrico. Sin embargo, la eficiencia de remoción de amonio, nitrito y nitrógeno total en el reactor fue >90% lo cual no coincide con el ensayo respirométrico. Esto podría deberse a que si bien la relación C/N del influente es alta (por ello la nitrificación es desfavorecida), el nitrógeno es eliminado del efluente por procesos asimilativos y una mínima tasa de nitrificación, suficiente para remover el amonio y el nitrito.

5.2.2 Aislamiento de cepas

Tabla XXIII. Cepas heterótrofas aerobias del lodo M aisladas en medio TSA. B= Bastones; Cat. = catalasa; Ox. = oxidasa; desnitrif.=desnitrifica. En color se indican las cepas desnitrificantes.

Aislamientos en TSA				
	Gram	Cat.	Ox.	Desnitrif.
M1	B -	+	+	Si
M2	B -	-	+	Si
M3	B -	-	-	Si
M4	B-	+	+	Si
M5	B -	-	-	no
M6	B -	-	+	Si

En el caso del reactor M se aislaron las cepas heterótrofas aerobias mas abundantes en la muestra del día 64. Se aislaron seis cepas de las cuales cinco resultaron ser desnitrificantes de acuerdo al ensayo de desnitrificación (Tabla XXIII).

Estos resultados demuestran que las condiciones de operación permitieron que se estableciera una

comunidad desnitrificante activa en el lodo M (donde el promedio de actividad

desnitrificante en el reactor M fue de 1061 $\mu\text{moles NO}_3^-/\text{gssV.día}$). Corresponde mencionar que muchas especies desnitrificantes son capaces de realizar respiración aerobia, y llevan a cabo la desnitrificación como vía alternativa en ausencia de oxígeno (Richardson, 2000).

5.2.3 Análisis de bacterias totales: T-RFLP del gen ARNr 16S

La estructura de la comunidad de bacterias totales se analizó mediante el T-RFLP del gen ARNr 16S con las enzimas *MspI* y *HhaI*.

El análisis de T-RFLP en las muestras del reactor M detectó un alto número de T-RFs con ambas enzimas (44 con *MspI* y 53 con *HhaI*) donde algunos de ellos se detectaron en mas de una muestra. Sin embargo ningún T-RF persistió en todas las muestras al igual que lo ocurrido en el reactor F (Fig. 37).

La comunidad microbiana analizada en función del gen ARNr 16S presentó índices de diversidad bajos (< 80% de Hmax) cuando se analizó con la enzima *HhaI*. Sin embargo, mediante el análisis con la enzima *MspI* se observó que las muestras de los períodos 1 y 4 fueron las que presentaron mayores índices de diversidad. (Tabla XXIV)

Durante el segundo período, el agregado de floculante afectó la actividad heterótrofa tal como se mencionó anteriormente. Se observó que el agregado también afectó la selección de la biomasa microbiana, la cual presentó mayor dominancia de especies y menor diversidad (Tabla XXIV). La comunidad seleccionada podría tener menor actividad específica y así mismo tener buena adaptación (o ser buenos competidores) a las condiciones de operación (por ello la mayor dominancia de especies). Esto pudo

haber sido la causa por la que el período 2 presentó una actividad heterótrofa menor y mas estable.

En el siguiente período el aumento de carga causó un cambio notorio en la estructura de la comunidad ya que se seleccionaron poblaciones bacterianas diferentes a las presentes en los períodos 1 y 2 (Fig. 38).

TABLA XXIV. Cálculo de los índices de diversidad de las distintas muestras a partir del análisis de los resultados del T-RFLP ARNr 16S con *HhaI* (A), *MspI* (B). *Las muestras correspondientes a los días 64 y 783 no pudieron analizarse con la enzima *HhaI* debido a problemas con la electroforesis del T-RFLP.

dia de operación											
A	132	153	216	252	335	495	509	586	599	637	789
Taxa_S	6	10	12	6	18	24	14	12	14	8	12
Individuals	11958	17056	18273	16416	18390	19696	19985	17910	12846	17984	21462
Dominance_D	0.3	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Shannon_H	1.5	2.0	2.1	1.4	2.4	2.7	1.9	2.0	2.0	1.7	2.0
Simpson_1-D	0.7	0.8	0.8	0.7	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Evenness_e^H/S	0.7	0.8	0.7	0.7	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	0.7	0.6
Hmax	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
H/Hmax*100	47.0	63.0	64.4	45.1	74.6	85.8	59.7	61.2	61.7	53.2	61.3

dia de operación													
B	64	132	153	216	252	335	495	509	586	599	637	783	789
Taxa S	10	10	6	7	5	9	8	8	13	12	14	12	13
Individuals	3014	3402	3835	3661	2948	3940	3168	3318	4246	4127	3550	3696	3631
Dominance D	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Shannon H	2.2	2.0	1.6	1.7	1.2	1.7	1.9	1.7	2.4	2.2	2.4	2.4	2.4
Simpson 1-D	0.9	0.8	0.8	0.8	0.6	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Evenness e^H/S	0.9	0.8	0.9	0.8	0.7	0.6	0.8	0.7	0.9	0.7	0.8	0.9	0.8
Hmax	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
H/Hmax*100	85.0	77.5	63.4	64.9	46.9	64.3	71.4	65.0	93.4	83.7	90.9	91.0	91.0

En el período 4, la velocidad de consumo de oxígeno fue mayor y la composición de la comunidad cambió, esto sugiere que se seleccionaron microorganismos con mayor velocidad de consumo de oxígeno. Se demostró mediante el análisis de cluster que la comunidad establecida en este período fue diferente a la del período 3, aunque presentó mayores diferencias con la estructura de la comunidad de los períodos 1 y 2 (Fig. 38). Dicho cambio en la comunidad podría explicarse por el ingreso y la adaptación de especies nuevas durante la reinoculación, y por otra parte, debido a la disminución de la etapa aerobia, donde se podrían seleccionar especies capaces de resistir largos periodos de anoxia.

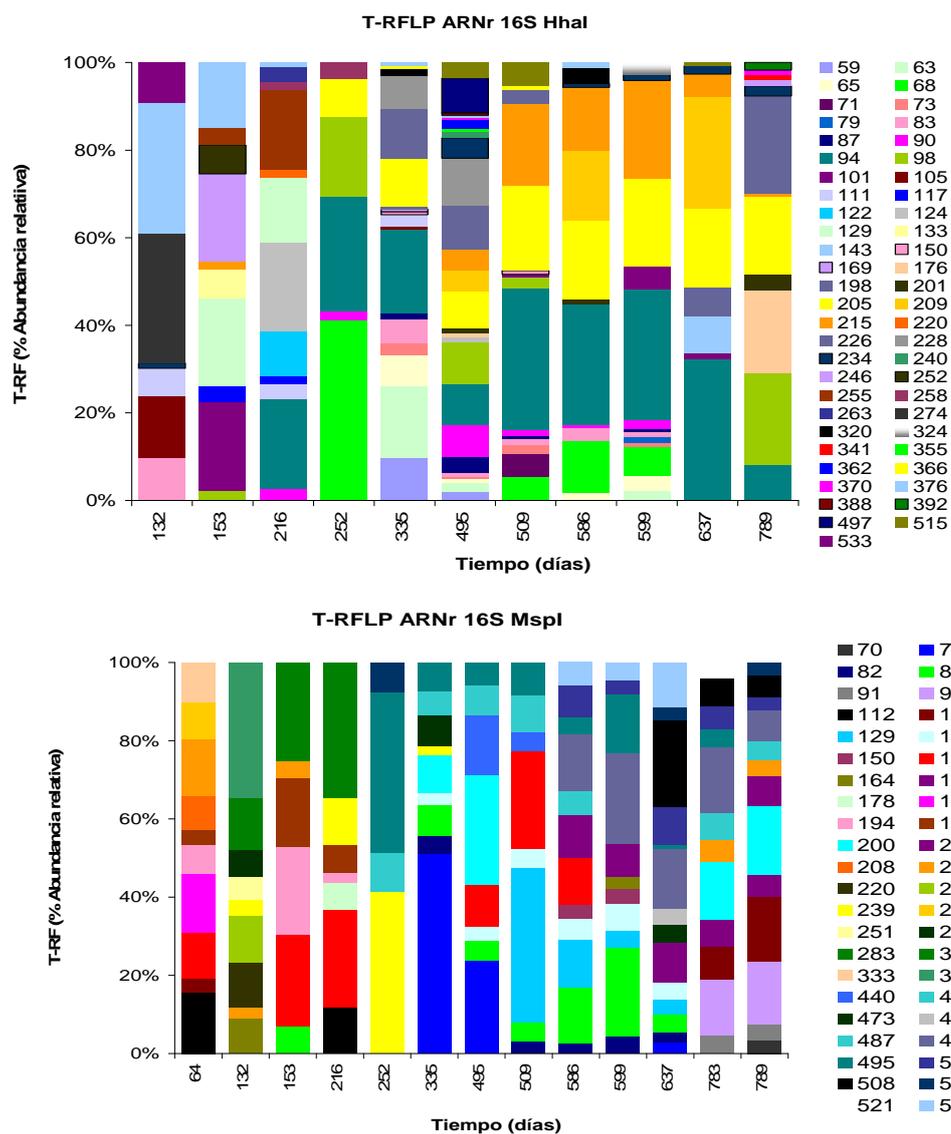


Figura 37. Análisis por T-RFLP del gen ARNr 16S de las muestras del lodo M. Resultados de la restricción con las enzimas *MspI* y *HhaI*. Un color = un T-RF

Por otra parte se demostró que los períodos con mayor actividad heterótrofa coincidieron con los periodos donde la comunidad bacteriana presentó índices de diversidad mayores. Esto pudo observarse ya que existió correlación positiva (**correlación r** de Pearson's > 0.8) entre los índices de diversidad utilizados y la actividad heterótrofa promedio para cada periodo (Tabla XXV).

Tabla XXV. Análisis de correlación de Pearson's entre la actividad potencial heterótrofa, los índices de diversidad Shanon y Simpson, y el índice H/Hmax*100. $\alpha = 0.05$

	Actividad H	Shanon	Simpson	H/Hmax*100
Actividad H	1			
Shanon	0.862	1.000		
Simpson	0.862	1.000	1.000	
H/Hmax*100	0.883	0.998	0.998	1.000

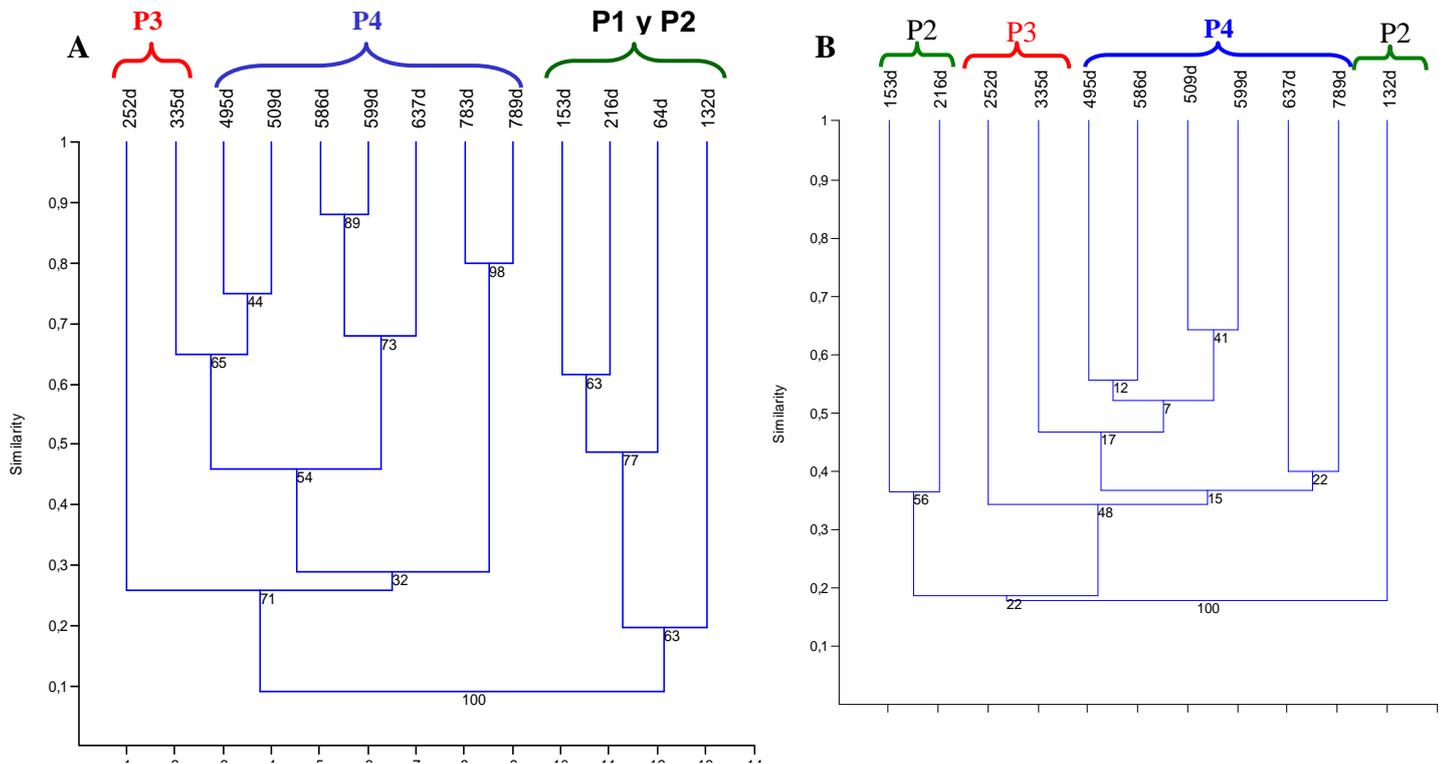


Figura 38. Dendrograma del análisis de cluster basado en el T-RFLP del ARNr 16S con la enzima *MspI* (A) y *HhaI* (B). Se construyó en base al índice de similitud presencia/ausencia Dice-Sorensen y el algoritmo UPGMA. En los nodos se observan los valores de bootstrap para 100 replicas.

5.2.3 Análisis de bacterias oxidantes de amonio (AOB): T-RFLP del gen *amoA*

A pesar de no haberse detectado bacterias oxidantes de amonio (mediante FISH) ni actividad nitrificante en el lodo M, se detectó la presencia de genes *amoA* por PCR y se analizó la comunidad mediante T-RFLP del gen *amoA*. A pesar de no detectarse con las otras técnicas (técnica respirométrica y la técnica FISH) se detectaron genes *amoA* por PCR a lo largo de 252 días de monitoreo, e incluso dicha población sufrió cambios en su estructura (Fig. 39). Durante todo el monitoreo se encontraron 8 T-RFs diferentes de los cuales a solo tres de ellos se pudo correlacionar con secuencias de *amoA* mediante restricción in silico. De esta manera se determinó que en el reactor M se encuentran presentes bacterias oxidantes de amonio del cluster de *Nitrosomonas europaea* (T-RF = 219bp) y del cluster *Nitrosospira/ Nitrosovibrio* (T-RF = 283bp) (Tabla XVI, capítulo I). El T-RF de 491pb (tamaño del gen *amoA* sin digerir) podría corresponder a: *Nitrosomonas communis*, *N. cryotolerans*, *Nitrosomonas sp Nm143* (Purkhold et al., 2000) o a *Nitrosomonas aestuarii*.

Los T-RFs con los tamaños 273, 268, 262, 208, y 67 no pudieron ser correlacionados con secuencias de *amoA* conocidas. Estos resultados sugieren que se trate genes *amoA* de especies aún no descritas.

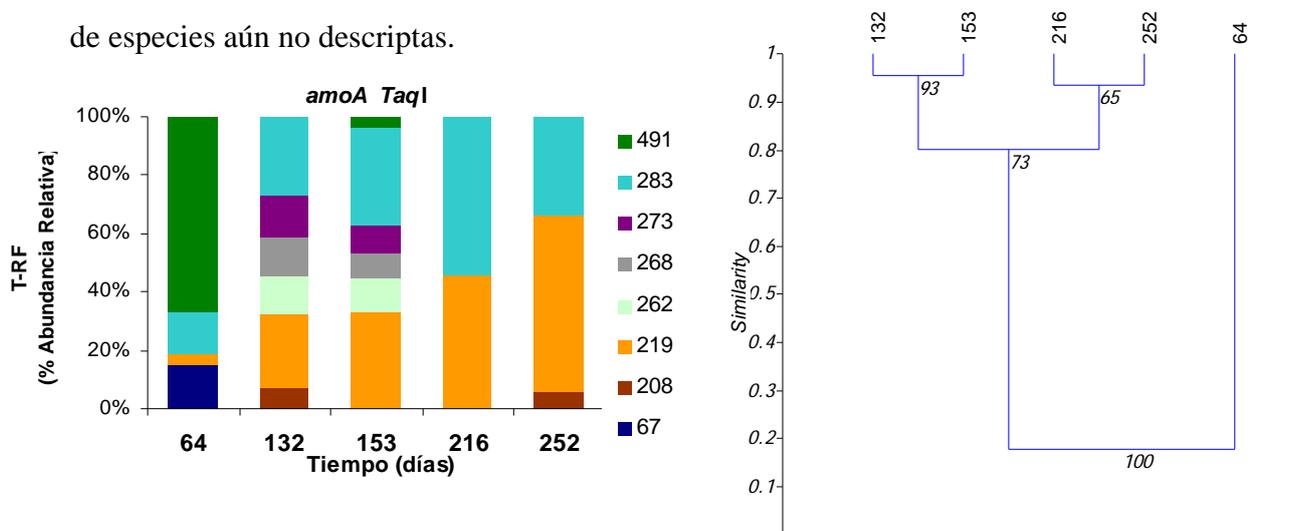


Figura 39. Análisis por T-RFLP del gen *amoA* con la enzima *TaqI* de las muestras del lodo M. Resultados de la restricción con la enzima *TaqI* (A) y dendrograma del análisis de cluster construido en base al índice de similitud cuantitativo Morisita y el algoritmo UPGMA. En los nodos se observan los valores de bootstrap para 100 replicas.

Consideraciones finales y conclusión general capítulo 2

El reactor M fue destinado principalmente a la remoción de materia orgánica de efluentes de industria láctea, mas que nada como una alternativa de tratamiento de tipo secundario. Se demostró que dicho reactor fue capaz de mantener una alta tasa de degradación de materia orgánica y de remover los compuestos nitrogenados que ingresaban en el influente a pesar de no detectarse actividad nitrificante por respirometría. Esto podría deberse a la utilización del nitrógeno para el metabolismo asimilativo de bacterias heterótrofas presentes y de esta forma podría darse la remoción de nitrógeno del efluente. Otra causa posible podría ser que exista una mínima tasa de nitrificación en el reactor (no detectable por respirometría) y que la misma sea suficiente para remover el poco amonio que ingresa con el influente. La desnitrificación ocurrió sin problemas en el reactor ya que se removió el nitrato del efluente, probablemente debido a que las condiciones de alimentación y de anoxia fueron adecuadas para dicho proceso.

El agregado de polímero floculante resultó una medida acertada para resolver el problema de sedimentación del lodo y para mejorar la estabilidad de la actividad ya que facilitó la predicción del comportamiento del reactor. Por otro lado es una medida viable (aunque costosa) para realizar a escala real cuando ello sea necesario. De todas formas deberían realizarse ensayos (respirométricos) en batch previos para cada reactor real para verificar que la actividad no sea inhibida. Por otra parte, en este período ocurrió un cambio en la diversidad de la comunidad de bacterias acompañado de un cambio en la actividad heterótrofa.

En el período 3 la comunidad microbiana sufrió un cambio en la estructura, sin embargo esto no fue reflejado en la actividad respirométrica. En este caso podría deberse a que si bien hubo un recambio de especies, aquellas del período 2 tal vez tenían la misma actividad específica que las del período 3. En cuanto al aumento de carga orgánica, si bien no afectó significativamente la actividad, el hecho que la misma no haya disminuido y que la performance del reactor se mantuvo es un resultado alentador ya que sugiere que el sistema es capaz de soportar sobrecargas sin afectar su desempeño. Esto es muy importante a escala real donde suelen ocurrir aumentos de producción, o fallas en el sistema de tratamiento previo lo cual implicarían sobrecargas del sistema.

En el cuarto período, la reinoculación causó un cambio notorio en la estructura de la comunidad bacteriana y en este caso se vio reflejado en la actividad heterótrofa. A su vez el cambio en la ley de control disminuyendo la fase aerobia fue positivo, ya que se mantuvieron niveles altos de actividad tanto respirométrica como en el reactor logrando disminuir el costo de aireación. En este período, las perturbaciones generaron cambios en la estructura de la comunidad, dándose un aumento en la diversidad y en la actividad heterótrofa.

Probablemente durante la reinoculación ingresaron nuevas especies al reactor, las cuales podrían tener mayor actividad específica o bien podrían estar en un estado “mas activo”. Luego se seleccionaron especies mejor adaptadas a las nuevas condiciones de aireación.

Se demostró entonces, que los cambios en la operación y algunas perturbaciones generan cambios en la estructura de la comunidad y en la diversidad microbiana, lo cual, en la mayor parte de los casos influye en la actividad y el desempeño del reactor. En los casos donde se da un recambio en la comunidad y no existe cambio en la actividad heterótrofa probablemente se deba a que el universo bacteriano heterótrofo es

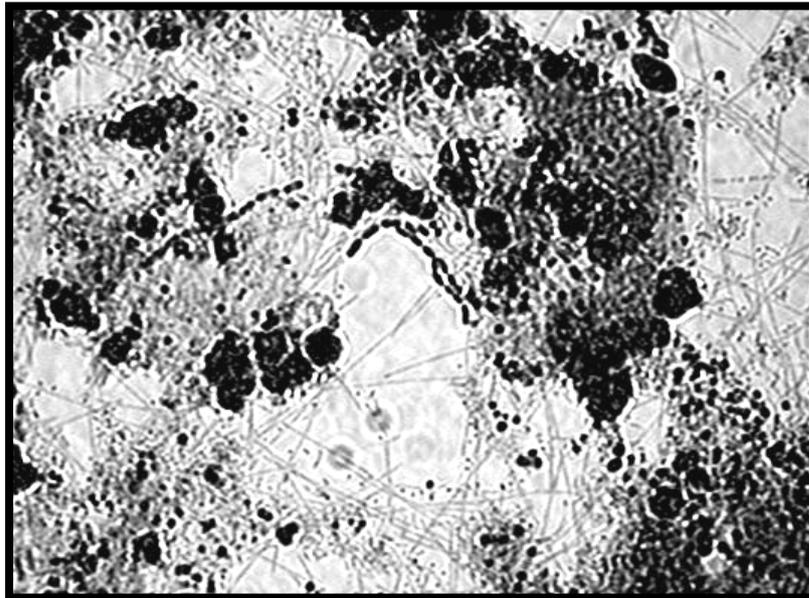
muy amplio y muchas veces podrían darse “sucesiones naturales” intercambiando especies pero no necesariamente la función. Es decir existen muchas especies que redundan sus funciones, por lo que los intercambios entre dichas especies no serían reflejados en la actividad.

El hecho de que exista una correlación positiva entre la actividad heterótrofa y la diversidad bacteriana tal vez podría deberse a que los sistemas con mayor diversidad son mas versátiles y se adaptan a pequeñas perturbaciones sin perder la “función” del ecosistema.

Resultados y Discusión

5.3 CAPITULO 3

Aplicaciones en el Modelado de Reactores SBR



Fotomicrografia del Lodo M

5.3 Aplicaciones en el modelado de reactores SBR

En los capítulos anteriores se estudió el comportamiento de la flora microbiana de dos reactores SBR bajo distintas condiciones de operación. En este capítulo el objetivo fue determinar algunos de los parámetros necesarios para las ecuaciones de modelado de reactores tipo SBR nitrificantes/desnitrificantes (como los sólidos por célula, la actividad nitrificante y desnitrificante por célula, etc). Estos datos resultan muy útiles ya que habitualmente se utilizan parámetros calculados para sistemas de lodos activados lo cual genera modelos inexactos cuando se extrapolan dichos valores a otros tipos de sistemas de tratamiento. Los parámetros determinados en esta tesis fueron utilizados en las ecuaciones de modelado desarrolladas en el marco del proyecto EOLI junto con el Instituto de Ingeniería Química y el Instituto de Ingeniería eléctrica de la Facultad de Ingeniería-UDELAR.

5.3.1 Determinación de sólidos por célula

Se seleccionaron dos cepas con características diferentes para obtener resultados representativos de los sólidos por célula. Se utilizó una cepa Gram negativa (*Thauera sp.*, Etchebehere y Tiedje, 2005) y una cepa Gram positiva (cepa F11, aislada en el presente trabajo) aisladas de sistemas de tratamiento de efluentes. Se realizó la medida de los SST y SSV para cada cultivo puro, y se realizó el recuento de células mediante FISH con la sonda EUB₃₃₈ y tinción con DAPI. A partir de estos datos (SST, SSV y células totales con DAPI) se calcularon los sólidos por célula. Los resultados obtenidos para la cepa F11 fueron 23 pg SST /célula y 14 pgSSV/célula. Mientras que para la cepa *Thauera sp.* Los valores fueron 6 pg SST /célula y 3 pgSSV/célula.

Al conocer la masa de una célula (de bacterias típicas en el lodo (Tabla XXVI), el número de células totales (tinción DAPI) y viables (sonda EUB en FISH), y el valor de

sólidos en el lodo se pudo calcular la fracción de biomasa total y biomasa activa en el reactor (Tabla XXVI). De esta forma además se determinó la fracción de sólidos que podría corresponder a otros materiales inertes solubles y particulados los cuales son considerados en las ecuaciones de modelado (Schmidell et al., 2007).

Tabla XXVI. Proporción de SSV correspondiente a la biomasa activa a partir del recuento por FISH y los dos valores de gSSV/célula obtenidos en este trabajo (a partir de los cuales se calculó el rango)

Tiempo (Día de operación)	% solidos biomasa activa (gSSVcelulas/gSSVtotal)*100		% solidos biomasa total (DAPI) (gSSVcelulas/gSSVtotal)*	
	RANGO		RANGO	
35	1.24	5.79	2.20	10.27
64	0.04	0.21	0.12	0.57
89	0.03	0.12	0.05	0.24
103	0.16	0.74	0.33	1.52
126	0.26	1.20	0.52	2.41
146	0.09	0.42	0.33	1.53

Según estos cálculos un porcentaje muy bajo (entre un 0.03 y un 5,8 %) de los sólidos suspendidos volátiles corresponde a la biomasa activa del lodo F (Tabla XXVI) donde el mayor porcentaje corresponde a sólidos inertes.

5.3.2 Determinación de la actividad específica y por célula

En el capítulo 1 se determinó la actividad nitrificante teórica por célula de modo de comparar dichos resultados con valores de bibliografía y obtener mas información para caracterizar la flora nitrificante presente en el reactor. Del mismo modo se realizó el cálculo de actividad heterótrofa y desnitrificante teórica por célula en base a una serie de cálculos a partir de los recuentos (NMP) y de la actividad desnitrificante.

Calculo teórico de actividad desnitrificante por célula

El número de bacterias desnitrificantes (BD), determinado mediante recuento por NMP en la muestra del día 427, fue de **2,1 x 10⁶ NMP BD/ml**. A partir de este dato y de la

actividad desnitrificante de este día se calculó la actividad desnitrificante por célula la cual resultó $4,2 \times 10^{-6}$ **umolesNO₃⁻/célula.día**. Además se calculó la velocidad de oxidación de acetato por célula, asumiendo que la totalidad de las bacterias responsables de la actividad heterótrofa observada son desnitrificantes (Tabla XXVII)

Tabla XXVII. Cálculo de actividad teórica desnitrificante y heterótrofa por célula según los valores de actividad desnitrificante y del recuento por NMP. BD = Bacterias desnitrificantes.

δδΔ	1180	8850	5·1E+00	†'SE-00	2'0E-0Δ
qis	mgO ₂ /gSSV.día	umoles NO ₃ ⁻ /gSSV.día	IMB/gSSV	umolesNO ₃ ⁻ /célula.día	mgO ₂ /célula.día
	Actividad del Lodo F		BD	Actividad/célula	

Determinación experimental de la actividad específica desnitrificante y heterótrofa

Por otro lado en este capítulo se presentan resultados de la actividad desnitrificante y heterótrofa por célula realizada experimentalmente a partir de cultivos puros procedentes del lodo F.

Para llevar a cabo estas medidas se utilizaron las técnicas de respirometría, FISH, medida de sólidos suspendidos volátiles y actividad desnitrificante. Por otro lado se midió la concentración de amonio en el tiempo cero y en el final de la medida de actividad desnitrificante. Los resultados indicaron que no hubo incremento en la concentración de amonio luego de la actividad desnitrificante lo que confirma que no se detectó el proceso de amonificación.

Los resultados de actividad desnitrificante (medidos) de la cepa F29 y de la cepa F25 (Tabla XXVIII) resultaron consistentes con la actividad promedio del reactor (6025 umoles NO₃⁻/gSSV.día). Esto podría sugerir que las cepas F29 y F25 fueron unas de las principales responsables de la actividad desnitrificante en el reactor. Sin embargo otra explicación podría ser que las bacterias desnitrificantes mas abundantes (no solamente F29 y F25) tienen una velocidad de desnitrificación similar a la de las cepas analizadas.

Con la determinación de actividad de la cepa F25 luego de incubación anóxica se observó que la actividad desnitrificante fue favorecida por un período de “activación previo” ya que la misma cepa cuando fue incubada en condiciones aerobias presentó una actividad desnitrificante menor.

La cepa F23 resultó con una actividad notoriamente superior a la del lodo, esto podría deberse a alguna de las siguientes razones: que dicha cepa no sea abundante en la comunidad desnitrificante del lodo F; o a que bajo las condiciones de operación la cepa si bien podría ser abundante tal vez su actividad era menor a la potencial.

Por otro lado se compararon los resultados obtenidos con datos de bibliografía donde la actividad desnitrificante de una cepa de *Pseudomonas sp.* (en condiciones de crecimiento exponencial) fue de 0.384 umoles de $N-NO_3^-$ /ml.día (Kariminiaae-Hamedani, 2004). Los valores de actividad de las cepas del reactor F resultaron un orden mayor que lo reportado por Kariminiaae. Sin embargo, el valor de actividad por mililitro puede no ser comparable entre dos cultivos si estos contienen distinto contenido de sólidos/ml. Por lo tanto, la diferencia entre los valores de actividad desnitrificante podrían deberse a que los sólidos suspendidos volátiles (proporcional a la biomasa) en el cultivo puro del dato de bibliografía tal vez era menor a los SSV en los cultivos puros de este trabajo (Tabla XXVIII)

Así mismo existen otros datos de bibliografía donde se han reportado actividades específicas de cultivos puros entre 69120 y 120960 umoles de $N-NO_3^-$ /gSSV.día (Etchebere et. al., 2001) los cuales son comparables con algunos de los valores obtenidos en el marco de esta tesis (Tabla XXVIII).

Los valores de actividad desnitrificante por célula empírica y teórica se diferenciaron entre uno y dos órdenes de magnitud (excepto en el caso de la cepa F25 cultivada en

anoxia previamente; Tabla XXVIII). Esto tal vez podría deberse a la subestimación del número de células desnitrificantes cuantificadas mediante la técnica de NMP utilizada para el cálculo teórico. En este caso la actividad teórica podría resultar hasta un orden de magnitud menor y de ese modo ser consistente con algunos de los resultados empíricos (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII. Valores de actividad desnitrificante de las cepas F29, F15 y F23. anox = condiciones de cultivo anóxico. aerob.=condiciones de cultivo aerobias. La actividad empírica por célula se estimó utilizando los valores de actividad específica y los valores de SSV por célula de la tabla XXVI. La actividad teórica corresponde a los valores calculados a partir del NMP de bacterias desnitrificantes y actividad desnitrificante del reactor F.

ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE

Cepa (cultivo puro)	Sólidos gSSV/ml	SSV/célula (rango)		Actividad empírica				Actividad teórica umoles NO ₃ /cel.día
		gSSV/cél	gSSV/cél	umoles NO ₃ /ml.día	umoles NO ₃ /gSSV.día	umoles NO ₃ /cél.día (rango)		
F29 anox	4.4E-04	3.0E-12	1.4E-11	2.5	5642	1.7E-08	7.9E-08	4.0E-06
F25 anox	8.9E-05	3.0E-12	1.4E-11	7.1	79596	2.4E-07	1.1E-06	
F25 aerob	7.8E-04	3.0E-12	1.4E-11	4.5	5793	1.7E-08	8.1E-08	
F23 aerob	8.2E-05	3.0E-12	1.4E-11	3.6	43849	1.3E-07	6.1E-07	

Consideraciones finales y conclusión general capítulo 3

Según los resultados obtenidos el lodo F presentó una pequeña fracción de biomasa activa comparado con el total de sólidos suspendidos volátiles. La fracción mayoritaria podría tratarse de materia orgánica de difícil degradación capaz de permanecer en el reactor ya sea porque es material sedimentable o material capaz de adsorberse a superficies e incluso a los flóculos de bacterias. Otra explicación podría ser que el alto tiempo de residencia celular del reactor (1 semana aprox.) produjo la retención de células favoreciendo la acumulación de biomasa muerta y aumentando la edad del lodo.

Por otro lado no debería descartarse que la técnica de FISH podría haber subestimado el número de células activas en el reactor y por lo tanto generar resultados erróneos en cuanto a la proporción de biomasa activa. Esto podría ocurrir ya que el recuento por FISH se dificulta en los casos donde las células forman flóculos, por lo tanto sólo se observan las células que se encuentran en la capa superior del mismo.

Se observó que la actividad desnitrificante específica de las cepas F25 y F29 fue consistente con la actividad del reactor. Por otro lado, se demostró que las condiciones previas de cultivo en anoxia favorecieron la actividad desnitrificante en la cepa F25. Esto podría deberse a que la duración del período aerobio afecta la permanencia en fase lag del crecimiento diáuxico (para oxígeno y nitrato como aceptores de electrones). Es decir, cuanto mayor tiempo se expongan las bacterias desnitrificantes a condiciones de aireación, mayor tiempo permanecerán en fase lag antes de comenzar a utilizar nitrato para su respiración. Actualmente existen investigaciones que indican la posible existencia de un operón para la respiración de nitrato que podría estar regulado de alguna forma por la presencia de oxígeno entre otros (Hamilton et al., 2005; Liu et al.,

1998). Este aspecto es muy interesante ya que los sistemas SBR a menudo poseen una fase aerobia extensa, la cual debe ser evaluada para lograr minimizar la fase lag de la desnitrificación.

CONCLUSIÓN GENERAL

Se aceptó la hipótesis parcialmente ya que sólo algunos cambios en la operación del reactor generaron cambios en la composición de la comunidad microbiana (reinoculación, agregado de floculante, aumento de carga). Por otro lado, el hecho que a su vez los cambios en la composición de la comunidad microbiana generarían cambios en la performance del reactor, no se cumplió en los casos de redundancia funcional, donde ocurre un cambio estructura pero se mantiene la eficiencia y la función.

En el comienzo de este trabajo se plantearon una serie de interrogantes (P). A continuación se resumen las respuestas (R) a las mismas.

P. ¿Los cambios en la estructura de la comunidad de bacterias se correlacionan con las variables de operación del sistema?

R. Si, existe correlación . Se demostró que los cambios en la operación del reactor generan cambios en el desempeño del reactor y en ciertos casos se encuentra relacionado con cambios en la composición de la comunidad microbiana. La estructura de la comunidad microbiana fue afectada en distinto grado según el tipo de perturbación o cambio de operación que fue efectuado. En ambos reactores la reinoculación parece haber sido la perturbación que causó mayores cambios en la comunidad y en la performance del reactor.

P. ¿Existe correlación entre la actividad potencial y la performance del reactor?

R. Si, en algunos casos (entre remoción de DQOs y Actividad heterótrofa, y entre remoción de Nt, de NH_4^+ y actividad de NOB). La medida de actividad respirométrica

reflejó los cambios en la performance de los reactores resultando en una técnica rápida y sencilla para monitorear sistemas de tratamiento reales. Por otro lado, las herramientas moleculares utilizadas permitieron identificar las especies nitrificantes y desnitrificantes más abundantes presentes y explicar parcialmente los cambios en la eficiencia de remoción de nutrientes. El estudio del gen *nirS* solo abarca el análisis de una fracción de la comunidad desnitrificante. Sería interesante analizar además el gen *nirK* en este tipo de comunidades.

P. ¿La flora presente en el reactor se recupera frente al agregado de tóxicos?

R. Si. Para implementar el uso de sistemas biológicos es importante conocer el comportamiento de la flora tanto en condiciones estables como en condiciones desfavorables, estudiando su capacidad de recuperación frente a distintas perturbaciones. Los resultados de esta tesis lograron demostrar que la flora relevante en el proceso de nitrificación y desnitrificación es capaz de recuperarse frente a perturbaciones en su ecosistema. Esto es muy importante en los reactores a gran escala ya que muchas veces en el efluente industrial llegan sustancias tóxicas, inhibitorias para los microorganismos.

P. ¿Los períodos de mayor actividad nitrificante del reactor se corresponden con la selección de especies con mayor actividad específica; o se corresponden con un aumento en el número de la bacterias nitrificantes presentes?

R. No se demostró la selección de especies con mayor actividad específica pero se observó que cuando hubo un cambio en la estructura de la comunidad AOB (en el lodo F) ocurrió la caída de actividad oxidante de amonio. Por otro lado se demostró los períodos en que el reactor F presentó mayor actividad nitrificante no se relacionaron con los períodos de mayor número de AOB y NOB según el análisis por FISH (ver sección

5.1.3). A su vez, si bien se observaron ciertos cambios con la aparición de nuevos taxones y en el aumento progresivo en la diversidad de AOB, la comunidad nitrificante se mantuvo estable durante la operación según los análisis de T-RFLP del gen *amoA*.

P. ¿Existe correlación entre la diversidad microbiana y la performance del reactor?

R. Si (en reactor M). No, en algunos casos de posible redundancia funcional. En el caso del reactor M se observó una correlación positiva entre la diversidad microbiana (según T-RFLP ARNr 16S) y la performance del reactor en cuanto a la remoción de COD (actividad heterótrofa).

P. ¿Se determinó cuáles son los microorganismos predominantes en el reactor y cual es su función en el mismo?

R. Desde el punto de vista microbiológico y científico se obtuvieron datos importantes, como ser la identificación de la flora nitrificante, desnitrificante y heterótrofa mas abundante los sistemas estudiados de la cual existe relativamente poca información. Las AOB y bacterias desnitrificantes predominantes se detectaron por medio del análisis de T-RFLP y clonado. Existe otra flora presente con funciones de remoción de DQO o funciones desconocidas (ej. *Bacteroidetes*).

P. ¿Todas las bacterias heterótrofas del reactor son organismos desnitrificantes?

R. No, según los métodos utilizados. Se demostró que la proporción de bacterias desnitrificantes en el total de bacterias heterótrofas presentes en los sistemas estudiados es < 1 (<100%). Este dato (η g, término menor a 1 que multiplica la expresión de Monod) es importante para el modelado de reactores en la ecuación que considera el crecimiento anóxico de bacterias heterótrofas (ver sección 5.1.4).

Globalmente los resultados fueron útiles para predecir y/o analizar el comportamiento biológico de las plantas de tratamiento de efluentes instruyéndonos acerca del funcionamiento interno del reactor. Por ejemplo, se observó que la disminución de la etapa aerobia baja los costos de operación y no afecta negativamente la actividad AOB y heterótrofa. Además, la reinoculación resultó útil para recuperar la actividad de ambos reactores. Estos conocimientos vinculados con el sistema SBR podrán ser extrapolados a los sistemas de tratamiento a gran escala. A su vez estos conocimientos podrán ser utilizados como insumos para adaptar sistemas de tratamiento existentes a sistemas tipo SBR de manera de mejorar la eficiencia de remoción de nutrientes.

PERSPECTIVAS

- Estudiar la función de las *Archaeas* presentes en el lodo F. ¿Podrían jugar un papel importante en la oxidación de amonio en este tipo de sistemas?
- Diseñar sondas de FISH específicas para las especies desnitrificantes encontradas (principalmente para las pertenecientes al género *Ochrobactrum*, el cual podría ser interesante para la degradación de sustancias recalcitrantes)
- Estudiar la función de los organismos *Bacteroidetes* encontrados mediante el análisis de clones del gen ARNr 16S. ¿Podrían tener un rol importante en la remoción de Fósforo?
- Analizar la comunidad desnitrificante mediante el análisis por T-RFLP del gen *nirK*.
- Estudiar la flora desnitrificante en el reactor M (se aislaron especies desnitrificantes y presentó remoción de N)

6. Referencias Bibliográficas

- Altibas U. (2001). Nutrient removal from low strength domestic wastewater in sequencing batch biofilm reactor. *Wat. Sci. Tech.* 44(1):181-186
- Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R. and Stahl D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
- Amann R. y Ludwig W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (5): 555-565
- Amann R., Ludwig W., Schleifer K-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual Microbial Cells Without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59(1): 143-169
- Atlas R.M y Bartha R. (2002) Ecología Microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Education. S.A. Madrid
- Bernet N., Delegenés N., Delegenés J-P., Molletta R. (2001). SBR as a relevant technology to combine anaerobic digestion and denitrification in a single reactor. *Wat. Sci. Technol.* 43(3):209-214
- Bock E., Schmidt I., Stueven R., Zart D. (1995). Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 163:16-20
- Bortone G., Gemelli S., Rambaldi A., Tilche A. (1992). Nitrification, denitrification and biological phosphate removal in sequencing batch reactors treating piggery wastewater. *Wat. Sci. Technol.* 26(5-6):977-985
- Borzacconi, L. Ottonello, G., Castelló, E., Pelaez, H., Gazzola, A. And Viñas, M. (1999) Denitrification in carbon and removal system for leachate treatment: performance of an upflow sludge blanket (USB) reactor. *Wat. Sci. Technol.* 40(8): 145-151.
- Bower, C.E., and T. Holm-Hansen. 1980. A salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37:794-798.
- Brady, N. C. (1984). The Nature and Properties of Soils. Macmillan New York, NY, pp. 283–302

- Braker G., Fesefeldt A., Witzel K.P., (1998) Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol.* 64(10): 3769–3775
- Brock, T. D., Mandigan, M.T. Biology of Microorganisms, Sixth Edition (1991). Prentice Hall.
- Brown, C. M. (1988). Nitrate metabolism in aquatic bacteria In: B. Austin (Ed.) Methods in Aquatic Bacteriology. John Wiley New York, NY, pp. 367–388
- Cabezas A. (2005). Microbiología de los procesos biológicos de nitrificación-desnitrificación en la descontaminación de desechos. Tesis de Maestría en Química, PEDECIBA-Facultad de Química-UDELAR
- Calli B., Tas N., Mertoglu B., Iane B., Ozturk I. (2003) Molecular analysis of microbial communities in nitrification and denitrification reactors treating high ammonia leachate. *Journal of Environmental Science and Health.* 38(10): 1997-2007
- Cuervo López, F.M., Gómez, J. (2004) Exopolymeric proteins related to sludge settleability in a denitrifying system. In Proceedings of “Anaerobic Digestion”, 10th World Congress, Montreal, Canada, 29th August-2nd September, 4, 1912-1915.
- Dabert P., Sialve B., Delgenes J., Moletta R., Godon J. (2001). Characterisation of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 (4): 500-509
- Daims H., Purkhold U., Bjerum L., Arnold E., Wilderer P., Wagner M. (2001). Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from molecular approaches. *Wat. Sci. Technol.* 43(3):5273-5284
- Daum M., Zimmer W., Papen H., Kloos K., Nawarath K., Bothe H. (1998). Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Current Microbiol.* 37:281-288
- Draper P., Cabezas A., Etchebehere C. Estudio de la flora nitrificante y desnitrificante de un sistema de tratamiento de efluente de una curtiembre por

Terminar Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). Presentación oral. VII Encuentro Nacional de Microbiólogos. 6 y 7 de octubre de 2005

- Dunbar J., Tiejnor L., Kuske C. (2000). Assessment of Microbial Diversity in Four Southwestern United States Soils by 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (7): 2943–2950
- Dunbar J., Tiejnor L., Kuske C. (2001). Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16SrRNA Genes from Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (1), 190-197.
- Egli K., Fanger U., Alvarez P., Siegrist H., van der Meer J., Zehnder A. (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Ach. Microbiol.* 175:198-207
- Etchebehere C., Errazquin I., Barrandeguy E., Dabert P., Moletta R., Muxí L. (2001). Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:259-265
- Etchebehere C., Tiedje J. (2005) Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. From a High-Nitrate-Removal rate reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9): 5642-5645
- Etchebehere, C., Errazquin M. I., Cabezas A., Pianzola M.J., Mallo M., Ottonello G., Borzacconi L. and Muxí L. (2002a). Sludge bed development in denitrifying reactors using different inocula-performance and microbiological aspects. *Wat. Sci. Technol.* 45(10): 365-370.
- Etchebehere, C., Errazquin, M. I., Dabert, P., and Muxí L. (2002b) Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40: 97-106.
- Feray C. (2000) Nitrification en sediment d'eau douce incidence de rejets de station d'épuration sur la dynamique de communautés nitrifiantes. Doctoral Thesis, Université Claude Bernard Lyon
- Focht, D. D., and W. Verstraete; (1977). Biochemical ecology of nitrification and denitrification *Adv. Microbial Ecol.*, vol. 1, pp. 135–214

- Gorska S.J., Garnaey K., Demuynck C., Vanrolleghem P., Verstraete W. (1996) Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Res.*, 30 (5), 1228-1236.
- Gutell R.R., Larsen N., and Woese C.R. (1994) Lessons from an Evolving Ribosomal RNA: 16S and 23S rRNA Structure from a Comparative Perspective. *Microbiol. Rev.* 58:10-26
- Hamilton R., Casaus A., Rasche M., Narang A., Svoronos S.A., Koopman B. (2005) Structured model for denitrifier diauxic growth. *Biotechnology and bioengineering* 90(4): 501-508
- Hammer Øyvind, Harper D.A.T., Ryan P.D. (2006). PAST - PAlaeontological STatistics, ver. 1.53
- Henze M., Harremoes P., Jansen J., Arvin E. (1997). Wastewater treatment-Biological and chemical process. Springer Verlag, 2° edición. Alemania.
- Horz H.P, Rotthauwe J.H, Thomas Lukow T., Liesack W. (2000). Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *J. Microbiol. Meth.*39(3):197-204
- Hoshino T., Terahara T., Tsuneda S., Hirata A., Inamori Y. (2005). Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. *J. Appl. Microbiol.*99: 1165-1175
- Hoshino T., Terahara T., Yamada K., Okuda H., Suzuki I., Tsuneda S., Hirata A., Inamori Y. (2006). Long term monitoring of the succession of a microbial community in activated sludge from a circulation flush toilet as closed system. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 459-470
- Informe Ambiental-Geo Montevideo, 2004
- Jetten MSM. (1997) Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 71: 75-93
- Juretschko S., Loy A., Lehner A., Wagner M. (2002) The Microbial Community Composition of a Nitrifying-Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *System. Appl. Microbiol.* 25: 84–99

- Juretschko S., Timmermann G., Schmid M., Schleifer K-H., Pommerening-Röser A., Koops H-P., Wagner, M. (1998) Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol* 64: 3042–3051
- Kariminiaae-Hamedani H.R., Kanda K., Kato F. (2004) Denitrification activity of the Ariake Sea Tideland. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97 (1): 39-44
- Kempen R., Mulder J.W., Uijterlinde C., Loosdrecht M.C. (2001). Overview: full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Wat. Sci. Technol.* 44(1): 145-152
- Kent Martin y Coker Paddy. 1997. Vegetation description and Analysis. A practical Approach. Editado por Wiley & Sons
- Killham, K.; 1986. Heterotrophic nitrification In: J. I. Prosser (Ed.)Nitrification IRL Press Oxford, UK, pp. 117–126
- Kitts C. L. (2001) Terminal Restriction Fragment Patterns: A Tool for Comparing Microbial Communities and Assessing Community Dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2 (1): 17-25.
- Koops H., Pommering-Roser A. (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology* 37:1-9
- Krebs C. (1985). Ecología. Estudio de la distribución y la abundancia. 2ª edición. Editorial Harla S.A. México. Versión en español.
- Kuenen, J. G., and L. A. Robertson (1987). Ecology of nitrification and denitrificationM In: J. A. Cole and S. Ferguson (Eds.)The Nitrogen and sulfur cycles Cambridge University Press Cambridge, UK, pp. 162–218
- Liu P., Svoronos S., Koopman B. (1998). Experimental and modeling study of diauxic lag of *Pseudomonas denitrificans* switching from oxic to anoxic conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 60 (6): 649-655
- Manly Bryan F.J. 1994. Multivariate Statistical Methods. A primer. 2ª Edición. Editado por Chapman & Hall

- Manser R, Muche K, Gujer W, Siegrist H (2005). A rapid method to quantify nitrifiers in activated sludge. *Water Res.* 39(8):1585-93
- Mulder J.W., y Kempen R. (1997). N-removal by SHARON. *Wat. Quality Intern.* 2:30-30-31
- Muller RH., Jorks S., Kleinstauber S., Babel W. (1998). Degradation of various chlorophenols under alkaline conditions by gram-negative bacteria closely related to *Ochrobactrum anthropi*. *J. Basic. Microbiol.* 38(4):269-281.
- Nicol G. y Schleper C. (2006). Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle?. *TRENDS in Microbiology* 14 (5): 207-212
- Norbis Walter (2005) Curso de Obtención y Análisis de Datos. Maestría en Ciencias Ambientales.
- Okabe S., Satoh H., Watanabe Y. (1999) In Situ Analysis of Nitrifying Biofilms as Determined by In Situ Hybridization and the Use of Microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7): 3182-3191
- Olsen, G.J., Lane, D.L., Giovannoni, S.J. y Pace, N.R. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.
- Osborne C., Rees G., Bernstein Y., Janssen P. (2006) New threshold confidence estimates for Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of complex bacterial communities *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2): 1270-1278
- Ozdemir G., Ozturk T., Ceyhan N., Isler R., Cosar T. (2003). Heavy metals biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource Technology.* 90:71-74
- Papen, H., R. von Berg, I. Hinkel, B. Thoene, and H. Rennenberg (1989). Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO₂-, NO₃-, N₂O, and NO production in exponentially growing cultures. *Appl. Env. Ecol.* 55: 2068–2072
- Park H-D, Wells G., Bae H., Criddle C., Francis C. (2006). Occurrence of ammonia-oxidizing Archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Env. Ecol.* 72 (8): 5643-5647
- Philippot, L. (2002) Denitrifying genes in Bacterial and Archaeal genomes. *Biochem. and Biophys. Acta* 1577: 355-376.

- Pla Laura. (1986) Análisis Multivariado: Método de Componentes Principales. Serie de matemática. Monografía n° 27. Secretaría General de los Estados Americanos. Programa regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C
- Purkhold, U., Pommerening-Röser A., Juretschko S., Schmid M., Koops H-P, Wagner M. (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Env. Ecol.*, 66:5368–5382
- Rich J., Heichen R., Bottomley P., Cromack K., Mylord D. (2003) Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soil. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 5974-5982
- Richardson D. (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* 146, 551-571.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R. et al. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Env Microbiol* 66: 2541-2547
- Sakano Y., Pickering K., Strom., Kerkhof L. (2002) Spatial distribution of total, ammonia oxidizing, and denitrifying bacteria in biological wastewater treatment reactors for bioregenerative life support. *Appl Environ. Microbiol.* 68(5): 2285-2293
- Schramm A., Beer D., van den Heuvel J., Ottengraf S., Amann R. (1999). Microscale distribution populations and activities of *Nitrospira and Nitrospira spp.* along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8): 3690-3696
- Shrestha N., Hadano S., Kamachi T., Okura I. (2001). Conversión of ammonia to dinitrogen in wastewater by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Biochem. and Biotechnol* 90(3):221-232
- Sørensen, J. (1978) Denitrification rates in a marine sediment as measured by the acetylene inhibition technique. *Appl. Environl. Ecol.* 36:139-143.

- Stein, L. Y., Arp, D. J., (1998) Ammonium limitation results in the loss of ammonia-oxidizing activity in *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol.* 64 (4), 1514-1521
- Strous M, Kuenen J., Jetten MSM (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3248-3250.
- Strous M, Van Gerven E, Kuenen JG & Jetten M (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2446-2448.
- Sultan S., Hasnain S. (2006) Characterization of an *Ochrobactrum intermedium* strain STCr-5 manifesting high level Cr(VI) resistance and reduction potential. *Enzyme and Microbial Technology*. Article in press
- Travers D., Etchebehere C., Reginatto V., Menes J. (2004) “Microbial characterization of a lab reactor reveals a new species of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria”. 10th International Symposium on Microbial Ecology. Cancún. México. 22-29 agosto 2004.
- Travers D., Reginatto V., Menes R.J. (2006) Characterization of autotrophic anaerobic ammonium oxidizing bacteria from a lab scale reactor inoculated with nitrifying sludge. Book of abstracts. 11th International Symposium on Microbial Ecology-ISME-11. Vienna, Austria. August 20-25, 2006, pp. A 476
- Schmidell W., Soares H., Etchebehere C., Menes R.J., Bertola N., Contreras E. (2007) Tratamento biológico de águas residuárias. Editora Tribo da Ilha. Florianópolis-SC. Brasil
- Vitousek P., Aber J., Howarth R., Likens G., Matson P., Schindler D., Schlesinger W., Tilman G. (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7(3): 737-750
- Wallner G, Erhart R, Amann R. (1995) Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1859-66
- Wang J., Battzis B., Lewandowski G. (1995) Fundamental denitrification kinetics studies with *Pseudomonas denitrificans*. *Biotechnology and Bioengineering* 47(1): 26-41

- Young-Ho Ahn (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*. Article in press
- Zumft , W.G. (1997) Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 61:533–616.

Aportes de la Tesis en publicaciones realizadas:

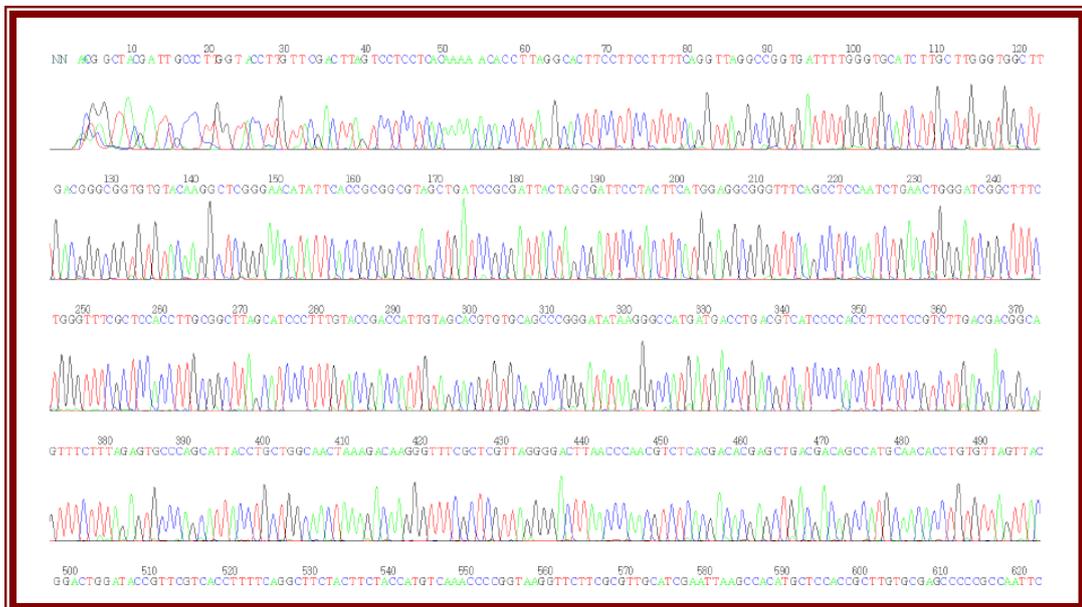
- Benitez A., Ferrari A., Gutierrez S, Canetti R., Cabezas A., Travers D., Menes J., Etchebehere C. (2005). Sequencing batch reactor as post-treatment of anaerobically treated dairy effluent. *Water science and technology* 54 (2): 199-206
- Ferrari, A. Benítez, P. Lema, C. Irigoyen, S. Gutiérrez, D. Travers, C. Etchebehere. (2005). “Effect of the flocculant periodical addition on the performance of a sequential batch reactor treating dairy wastewater.” ENPROMER. 2° Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4° Mercosur Congress on Proceses Systems Engineering. Costa Verde-RJ-Brasil. 14 al 18 de agosto de 2005
- Travers D., Cabezas A., Menes J., Etchebehere C. (2005a) “Estudio de la comunidad microbiana de un biorreactor SBR (Sequencing Batch Reactor) para el tratamiento de efluentes de la industria láctea”. *Actas de Fisiología. XI Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Volumen 10, pág 232. Minas, Lavalleja. 2 al 4 de setiembre de 2005*
- Travers D., Cabezas A., Menes J., Etchebehere C. (2005b). Identificación de la flora responsable de la remoción de nitrógeno en un sistema de tratamiento de efluentes de industria láctea”. *VII Encuentro Nacional de Microbiólogos. Proceedings, pag 43. Facultad de Ciencias, Montevideo. 6 y 7 de octubre de 2005.*
- Travers D., Menes R.J (2006). Community analysis of ammonia oxidizing bacteria in a sequencing batch reactor for nitrogen removal. *11th International Symposium on Microbial Ecology-ISME-11. Vienna, Austria, 20 al 25 de agosto de 2006. Proceedings, pag. A282*
- Travers D., Tiedje J., Etchebehere C. (2005c) “Estudio de la diversidad de bacterias desnitrificantes en sistemas de tratamiento de efluentes industriales

utilizando el gen de la nitrito reductasa”. Workshop Internacional sobre Microbiología Ambiental “Desafíos y Oportunidades en América del Sur”. UNICAMP, Campinas, Brasil. 19 al 21 de setiembre de 2005

▪ **Páginas web consultadas:**

- http://www.minag.gob.pe/rrnn/rrnn_agua.shtml
- <http://www.conaprole.com.uy>
- <http://www.fao.org/docrep>
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.gencat.net/salut/depsan/units/sanitat/html/es/dir90/nitratos.htm>
- <http://www.tierramerica.net/2002/0324/noticias4.shtml>
- <http://www.anammox.com>
- BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- <http://Lynxified.Pages.de/pub/ARB/>
- The prokaryotes; <http://141.150.157.117.8080/prokPUB>

7.ANEXOS



ANEXO 1 : Medios, Reactivos Y Buffers

Medio LB (Luria Bertoni)

Composición en 1000ml:

Triptona.....10g

Extracto de levadura.....5g

NaCl.....10g

Agar.....15g

Agua destilada.....1000ml

Se ajustó el pH 7 y se autoclavó 15min a 121°C.

Para la selección de clones resistentes a ampicilina y kanamicina se dejó enfriar a temperatura ambiente el LB estéril y se agregaron los antibióticos asépticamente (tal que la concentración final fuese de 100 ug/ml ampicilina y 50 ug/ml kanamicina). Se repartió en placas (20ml/placa)

Buffer fosfato

Composición en 1000ml:

K_2HPO_45,3 g

KH_2PO_42,66 g

NaCl.....5,8 g

Agua destilada.....1000ml

Se ajustó a pH = 8 para realizar la resuspensión de los lodos luego del lavado.

Medio para heterótrofos aerobios: TSA (BactoTryptic Soy Agar, Difco)

Composición en 1000ml:

Digerido pancreático de caseína15 g

Digerido papaíco de soja5 g

Cloruro sódico5 g

Agar15 g

Agua destilada1000 ml

Se ajustó el pH 7.3 ± 0.2 y se autoclavó 15min a 121°C. Se repartió en placas

(20ml/placa)

Medio para desnitrificantes: BCY-acetato/nitrato

Composición en 500ml:

- K_2HPO_4 2.65g
- KH_2PO_4 1.33g
- Extr. Levadura..... 0.25g
- NH_4Cl 0.50g
- Trazas Minerales..... 2.50ml
- Na_2S (25g/L)..... 0.10 ml
- Rezarsurina..... 0.50ml de solución 0.2%
- KNO_3 0.36g
- KAc..... 0.92g
- H_2O 500ml
- NaCl..... 2.9g

Se dejó hervir, y se enfrió con gaseado de N_2 y agitación. Se controló el pH a 7 y se repartió 10ml/vial gaseando con N_2 . Se cerró con tapón de goma y precinto. Se esterilizó en autoclave a $121^\circ C$ y 1.05 atm. x 15 min. el mismo día.

Luego se agregó con jeringa estéril 0.2 ml de solución CaMg ($MgCl_2 \cdot 2H_2O$ 7.5 g/L y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.72 g/L) y 0.1ml de vitaminas. Se resuspendió la colonia en 500ul de suero fisiológico estéril (en el caso de cultivo puro) o se realizó la dilución del lodo (en

el caso de recuento por NMP) y se sembró el volumen indicado (500-1000 ul) en el vial con una jeringa estéril en condiciones asépticas. Luego se incubó a 37°C 24-72hs

Solución de vitaminas para BCY

Biotina (Vit K)..... 2.0 mg/L

Ac. Fólico.....2.0 mg/L

Piridoxina. HCl (B6).....10.0 mg/L

Tiamina HCl (B1).....5.0 mg/L

Riboflavina (B2)5.0 mg/L

Ac. Nicotínico.....5.0 mg/L

DL-Pantoneato de Ca.....5.0 mg/L

Composición del loading buffer (6x) para corrida en geles de agarosa

0,25 % azul de Bromofenol

50% glicerol en agua

ANEXO 2: % Formamida

Buffer de Hibridación

Para 2 ml de buffer de hibridación se mezclaron: 40 ul Tris-HCl 1 M pH 8, 360 ul de NaCl 5M, 2 ul de SDS. Además se agregó agua y formamida según el porcentaje de formamida necesario para cada sonda tal como se detalla a continuación (Tabla A).

Tabla A: Volúmenes de formamida y de agua mQ agregados al buffer de hibridación (2 mL volumen final) dependiendo de las condiciones de astringencia requerida (a mayor concentración de formamida, mayor astringencia)

% Formamida (v/v)	Volumen agregado de Formamida (ul)	Volumen agregado de Agua mQ (ul)
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700

Buffer de lavado

Para 50 ml se mezclaron: 1 ml de Tris-HCl 1M pH 8, 500 ul de EDTA 0.5M (solo si formamida en buffer de hibridación era mayor a 20%), NaCl según se detalla a continuación (Tabla B) según el porcentaje de formamida utilizado, y se completó con Agua mQ hasta 50 ml. Al final de la preparación se adicionaron 50ul de SDS.

Tabla B: Volúmenes de NaCl y de EDTA agregados al buffer de lavado (50 mL volumen final) dependiendo de las condiciones de astringencia requerida (a mayor concentración de NaCl, menor astringencia)

% Formamida (v/v)	Volumen agregado de NaCl 5M (ul)	Volumen agregado de EDTA 0.5M pH 8.0 (ul)
0	9000	0
5	6300	0
10	4500	0
15	3180	0
20	2150	500
25	1490	500
30	1020	500
35	700	500
40	460	500
45	300	500

ANEXO 3 Tabla del Número Mas Probable (NMP)

Tabla del Número Más Probable (NMP) por ml de muestra, utilizando series de tres tubos inoculados con 10, 1.0, 0.1 ml respectivamente.

10	1	0.1	NMP/ml	10	1	0.1	NMP/ml
0	0	0	0	2	0	0	9
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	3.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	>1100

ANEXO 4 Condiciones De Amplificación Por PCR

PCR del gen 16S

Para una reacción de 50ul mezclaron:

H2O	32 ul
Buffer 10x	5 ul
MgCl ₂ (25mM)	3 ul
BSA	0.5 ul
dNTPs (2.5mM)	4 ul
primer 27F* (10uM)	2 ul
primer 1492 R (10uM)	2 ul
Taq Invitrogen® (5U/ul)	0.5 ul

Se agregó 1ul de ADN para cada reacción (aumentando o disminuyendo esta cantidad cuando fue necesario)

La reacción de PCR 16S se realizó utilizando los siguientes ciclos de tiempo y temperatura:

5' 94°C + 30 ciclos (1' 94°C + 1' 55°C + 3' 72°C) + 7' 72°C

*Para la reacción por PCR previa al T-RFLP se sustituyó el primer 27F por el primer de la misma secuencia pero marcado con fluoróforo FAM (fluoróforo 6-FAM (5-[6]-carboxy-fluorescein, derivado de la fluoresceína), 27F-6-FAM.

PCR *amoA*

Para una reacción de 50ul se mezclaron:

H2O	34.75 ul
Buffer 10x	5 ul
MgCl ₂ (25mM)	1.5 ul
BSA	0.25 ul
dNTPs (2,5 mM)	4 ul
AmoA R (10uM)	1.5 ul
AmoA* F (10uM)	1.5 ul
Taq Invitrogen® (5U/ul)	0.5 ul

Se agregó 1ul de ADN para cada reacción (aumentando o disminuyendo esta cantidad cuando fue necesario)

La reacción de PCR *amoA* se realizó utilizando los siguientes ciclos de tiempo y temperatura:

5' 94°C+ 35 ciclos (90'' 60°C+ 90'' 72°C+ 60'' 94°C)+ 60'' 94°C + 90'' 60°C+ 10' 72°C

*Para la reacción por PCR previa al T-RFLP se sustituyó el primer *amoA* F por el primer de la misma secuencia pero marcado con fluoróforo FAM (fluoróforo 6-FAM (5-[6]-carboxy-fluorescein, derivado de la fluoresceína), *amoAF-6-FAM*).

PCR del gen *nirS*

Para una reacción de 50ul se mezcló:

H2O	34.5
Buffer 10x	5
MgCl ₂ (25mM)	2.5
BSA	0.5
dNTPs (2.5mM)	4
primer <i>nir</i> F* (10uM)	1
primer <i>nir</i> R (10uM)	1
Taq Invitrogen® (5U/ul)	0.5

Se agregó 1ul de ADN para cada reacción (aumentando o disminuyendo esta cantidad cuando fue necesario). Los primers *nir* fueron *nirS-1F* y *nirS-6R* para el gen *nirS*, y *nirK-F* y *nirK-R* para el gen *nirK* utilizando las mismas condiciones de reacción para ambos genes.

La reacción de PCR del gen *nir* se realizó utilizando los siguientes ciclos de tiempo y temperatura:

Ciclo: PCR Program. Touch down

95°C 5'

1) 95°C 30'' + 56°C 40'' + 72°C 40''

2) 95°C 30'' + 55.5°C 40'' + 72°C 40''

“

10) 95°C 30'' + 51°C 40'' + 72°C 40''

10 Ciclos touch down
baja la T 0.5°C/ciclo

95°C 30'' + 54°C 40'' + 72°C 40''

25 ciclos

72°C 7' + 4°C ∞

*Para la reacción por PCR previa al T-RFLP se sustituyó el primer nirS-F por el primer de la misma secuencia pero marcado con fluoróforo FAM (fluoróforo 6-FAM (5-[6]-carboxy-fluorescein, derivado de la fluoresceína), nirS-1F-6FAM.

PCR del inserto en los clones con primers del vector: T3/T7

Para una reacción de 50ul se mezclaron:

H2O	37,75 ul
Buffer 10x	5 ul
MgCl ₂ (25mM)	3 ul
BSA	0,5 ul
dNTPs (2,5 mM)	2,5 ul
T3 (50uM)	0,5 ul
T7 (50uM)	0,5 ul
Taq Fermentas® (5U/ul)	0,25ul

Se picó un clon (con *tip* estéril) asepticamente y se colocó en el eppendorf de reacción mezclando bien sin que queden burbujas (se realizó el mismo procedimiento para cada clon). Se llevó a cabo el ciclo de tiempo y temperatura sugerido por el fabricante del kit de clonado (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing. Invitrogen Catalog nº K4580-01).

ANEXO 6: Normalización de Datos del T-RFLP

Los resultados del análisis por T-RFLP fueron normalizados utilizando una modificación de la técnica reportada por Dunbar (Dunbar y cols., 2000; Dunbar y cols., 2001) de manera de poder comparar los datos obtenidos para diferentes muestras. De este modo se minimizó el error debido a las diferencias de concentración de ADN extraído en cada muestra y el sesgo en la amplificación por PCR y la restricción de las distintas muestras. Además, con un criterio conservador se fijó un umbral de base constante (límite inferior) por debajo del cual los picos no se tuvieron en cuenta. De esta manera se minimizó el ruido de fondo.

Para ello se utilizaron los datos extraídos de cada cromatograma de las distintas muestras. Primeramente se realizó la suma de las todas las alturas de los picos (intensidad de fluorescencia) para cada perfil de datos (para cada muestra). Los valores de altura total para cada perfil fueron normalizados a un mismo valor (el menor valor de altura total) calculando el factor de corrección para cada perfil de datos.

Luego cada una de las alturas de pico fue dividida por el factor requerido para su perfil de datos para calcular la altura normalizada de cada pico.

Se fijó una línea de base constante de 50 unidades de fluorescencia (UF) tal como ya se ha reportado (Osborne y cols., 2006), de modo que los picos que luego de la normalización resultaron con altura igual o menor a 50UF fueron descartados del perfil.

Como ejemplo a continuación se presentan los resultados del T-RFLP *amoA* con *CfoI* del reactor F antes y después de la normalización. Tal como lo indica el ejemplo, las muestras que presentaron intensidad de fluorescencia significativamente menor que las

demás (diferencias de uno o mas ordenes de magnitud) fueron eliminadas del análisis (Fig. A).

Figura A: resultados del T-RFLP *amoA* con la enzima *CfoI* del reactor F. En amarillo se remarcó la muestra que no fue tomada en cuenta para el cálculo ya que la intensidad de fluorescencia total (suma de alturas de pico) fue dos órdenes menor que las demás muestras. Debajo se presentan los resultados de los cálculos realizados para la normalización.

T-RF (pb)						
Muestra	71	134	301	494	Suma total	factor
64	6972	7019	627	254	14872	1
89	7023	7112	747	409	15291	1.03
103	7189	7040	1178	888	16295	1.10
126	6820	7070	744	2391	17025	1.14
146	4631	7119	7227	6222	25199	1.69
185	0	172	0	0		

T-RF (pb) normalizado					
Muestra	71	134	301	494	Suma total
64	6972	7019	627	254	14872
89	6818	6905	725	397	14846
103	6535	6400	1071	807	14814
126	5982	6202	653	2097	14934
146	2740	4212	4276	3682	14911

ANEXO 7: Efecto de la Alitiourea (ATU) en la actividad nitrificante

Se determinó la concentración inhibitoria de la alitiourea (ATU) en la actividad oxidante de amonio del lodo F (mediante respirometría) y se estudió la capacidad de recuperación de dicha actividad.

Para ello previamente se aireó el lodo toda la noche. Luego se midió la actividad oxidante de amonio potencial (sin agregado de ATU) el cual se estableció como el punto de inhibición “cero”. A partir de ese momento se comenzó a agregar ATU aumentando sucesivamente la concentración y midiendo la actividad oxidante de amonio (Tabla A). De este modo se determinó la concentración efectiva para inhibir el 20% de la actividad nitrificante (CE_{20}) y el 40% de la misma (CE_{40}). Se observó que la actividad oxidante de amonio fue aumentando aún cuando se adicionaba ATU hasta llegar a una concentración del inhibidor de 0.514 μ M. A partir de allí se comenzó a observar una disminución en la actividad potencial oxidante de amonio (Tabla A).

El fenómeno inicial podría deberse a un retardo en la activación de enzimas involucradas en la oxidación de amonio por lo que pudo verse enmascarada la inhibición causada por la ATU. Debido a esto se repitió el ensayo para verificar las concentraciones inhibitorias de ATU. Para ello primeramente se midió la actividad oxidante de amonio hasta llegar a un valor constante de la misma y luego se chequearon dos concentraciones de ATU (Tabla B).

Tabla A: resultados del efecto de concentraciones sucesivas de ATU (concentración final) en la actividad oxidante de amonio. Se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración de ATU en base a la actividad potencial máxima obtenida (con concentración ATU = 0.514 uM)

Concentración ATU (uM)	Actividad ox. Amonio mgO2/ml*h	Inhibicion (%)
0	0,0298	0
0,171	0,0344	0
0,171	0,0375	0
0,343	0,0397	0
0,514	0,0399	0
0,686	0,0365	8,5
0,857	0,0328	17,7
1,028	0,0249	37,5
1,200	0,0180	54,9

Tabla B: verificación de las concentraciones inhibitorias de ATU (concentración final) en la actividad oxidante de amonio.

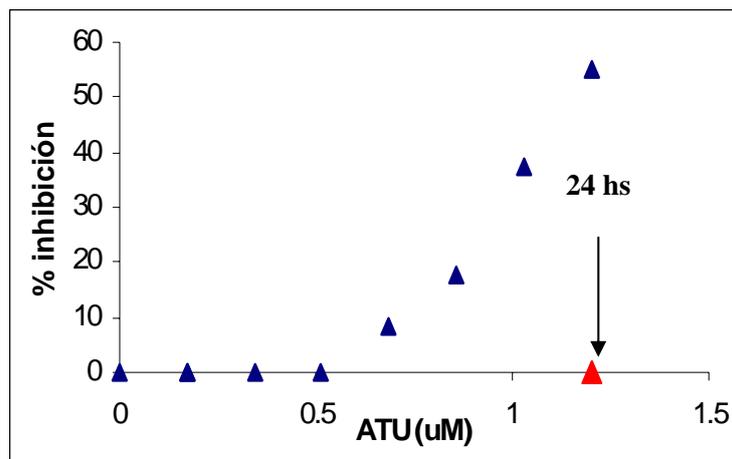
Concentración ATU (uM)	Inhibicion (%)
0.686	24,7
1.028	45,5

Se observó que con una concentración de ATU de aproximadamente 0.7 uM se obtuvo entre un 18 % y un 25 % de inhibición de actividad oxidante de amonio. Mientras que con una concentración de ATU de aproximadamente 1 uM se obtuvo entre un 38 % y un 46 % de inhibición (Fig. a).

Luego de finalizar los ensayos de inhibición (hasta un 50 % de la actividad potencial) se mantuvo aireando el lodo durante 24 hs. Luego de ello se midió la actividad potencial oxidante de amonio agregando 60 ppm de N-NH₄ (c.f) de modo de conocer si la

actividad nitrificante era capaz de recuperarse del inhibidor. Los resultados obtenidos demostraron que luego de 24 hs la actividad oxidante de amonio se recuperó en un 100% (Fig. a).

Figura a: porcentaje de inhibición de la actividad oxidante de amonio en función de la concentración final de ATU. Se señala que luego de 24 hs se recuperó en un 100 % la actividad desapareciendo el efecto inhibitorio de la ATU.



ANEXO 8: T-RFLP *amoA* con *AluI*

Mediante el análisis con la enzima *AluI* se demostró que la comunidad mantuvo los mismos taxones durante todo el monitoreo. Sin embargo debido a que solo pudieron analizarse tres muestras con esta enzima, los datos no fueron utilizados para comparar la diversidad y la similitud entre muestras. Luego de normalizar los datos, se obtuvieron perfiles similares, sin embargo se observó un número de TRF-s mayor al esperado los cuales no pudieron ser identificados (Fig. A).

A pesar de ello se calculó la similitud entre muestras tratadas con *AluI* y se observó que los resultados fueron concordantes con lo observado anteriormente con las enzimas *TaqI* y *CfoI* (Tabla A).

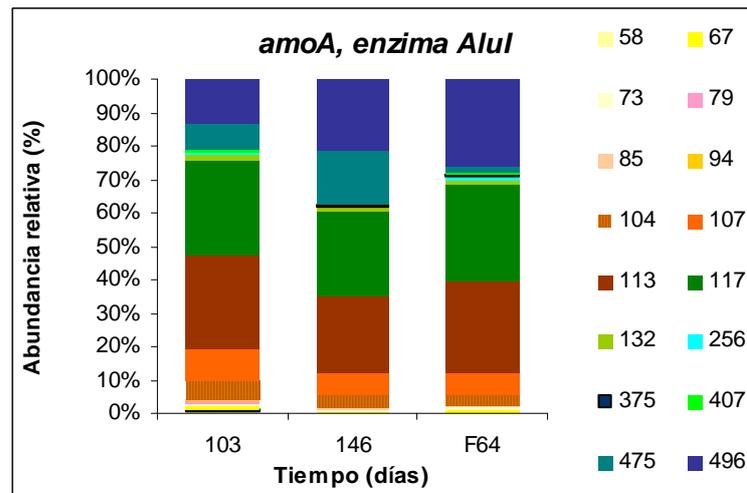
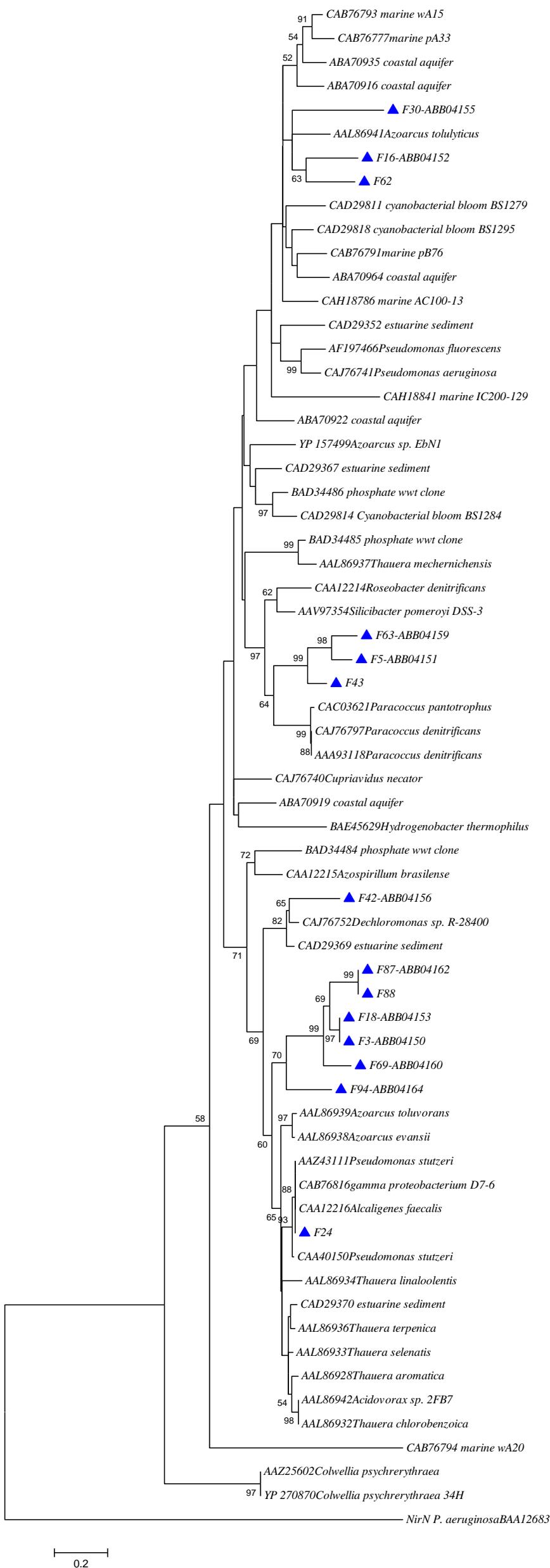


Figura A: Análisis por T-RFLP del gen *amoA* de tres muestras del lodo F. Resultados de la restricción con la enzima *AluI*. Se indica el tamaño de los T-RF en pb.

Tabla A: Matriz de similitud entre muestras del lodo F partir del índice de similitud cuantitativo Morisita y los resultados del T-RFLP *amoA* con *AluI*. Las muestras resultaron tener > 93 % similitud entre sí.

	F103	F146	F64
F103	1	0,95499	0,94472
F146	0,95499	1	0,93849
F64	0,94472	0,93849	1

Por otro lado se utilizó la enzima *RsaI* ya que se buscaba identificar de forma mas precisa las especies de AOB presentes en el reactor. Sin embargo los resultados obtenidos con *RsaI* no fueron confiables ya que los controles (T-RFLP de clones del gen *amoA*) no resultaron como se esperaba (los cromatogramas de los clones presentaron >10 T-RFs). Por lo tanto, no se analizó el resultado obtenido con dicha enzima.



0.2

Figura 21: árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales de 119 aminoácidos del gen *nirS* basado en el análisis neighbor-joining con el modelo matricial de Dayhoff. Barra = diferencia de 20 aminoácidos en 100. Se presentan valores de bootstrap mayores a 50 en 100 réplicas.

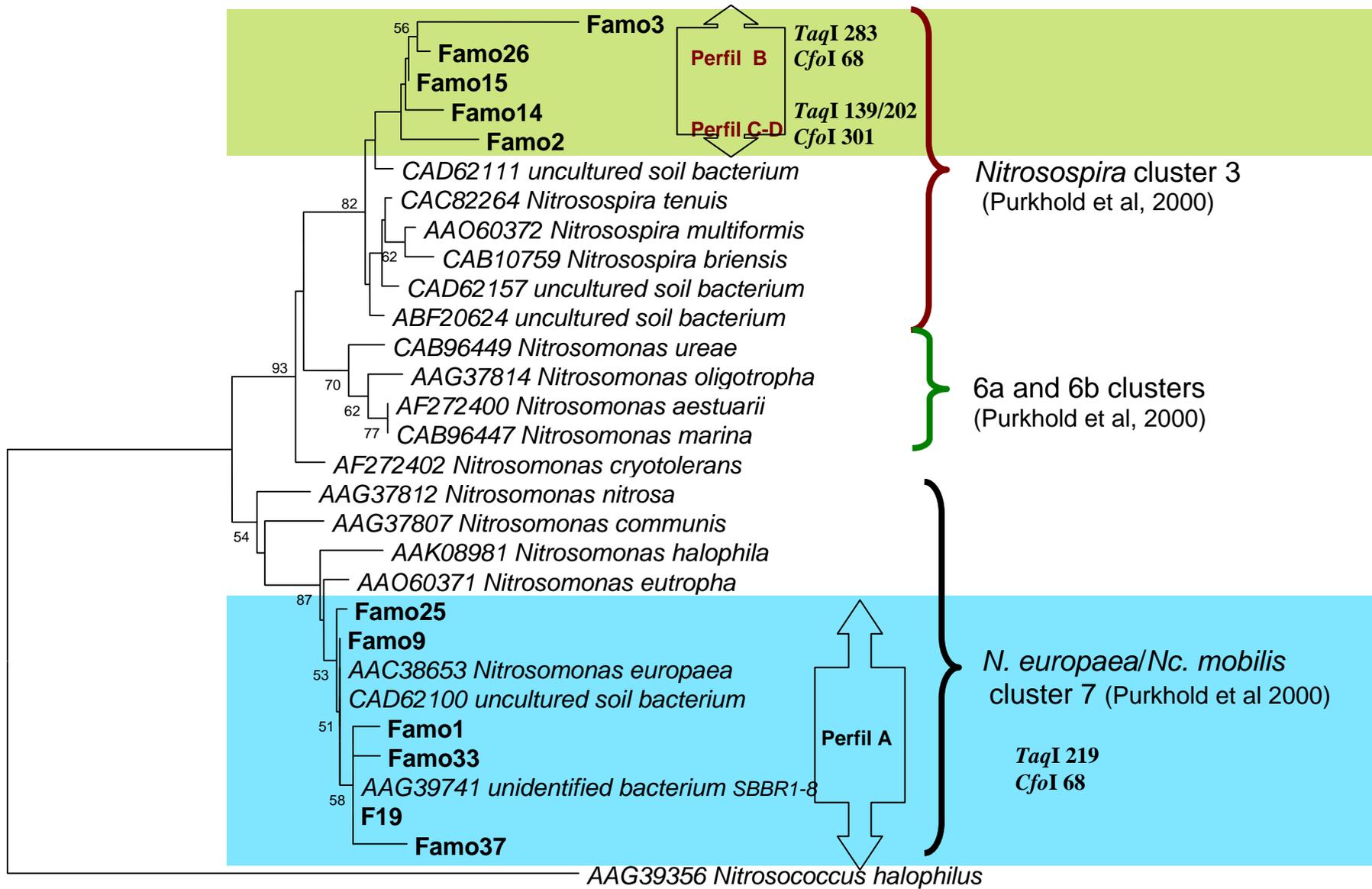


Figura 28: árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales de 97 aminoácidos del gen *amoA* basado en el análisis neighbor-joining con el modelo matricial de Dayhoff. Los números en negrita indican el tamaño de OTUs (operational taxonomic units= lengths of terminal restriction fragments) para el grupo señalado con las enzimas *TaqI* y *CfoI* según el análisis in sílico de T-RFLP. Barra = diferencia de 10 aminoácidos en 100. Se presentan valores de bootstrap mayores a 50 en 100 réplicas.